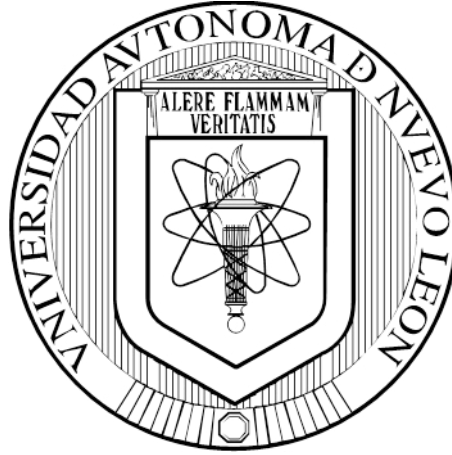


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN IN VITRO Y EFECTO EN CULTIVO CELULAR  
DE VARIANTES EN LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO A $\beta$**

**POR**

**QFB ANA ESTHER ESTRADA RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**JULIO 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN IN VITRO Y EFECTO EN CULTIVO CELULAR  
DE VARIANTES EN LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO A $\beta$**

**POR**

**QFB ANA ESTHER ESTRADA RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**JULIO 2016**

El presente trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio de Biología Estructural del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección de la Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret y la Co-Dirección del Dr. Román Vidal Tamayo y la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

Este trabajo cuenta con apoyo por parte de CONACYT mediante la convocatoria de Ciencia Básica bajo el número de registro 220006 y estuvo aprobado por el Comité de Ética con el número de registro BI13-007.

Caracterización in vitro y efecto en cultivo celular de variantes en la  
agregación del péptido A $\beta$ .

Aprobación de la tesis:



---

DRA. C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET  
Directora de Tesis.



---

DR. C. ROMÁN VIDAL TAMAYO RAMÍREZ  
Co-Director de Tesis.



---

DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ  
Miembro de Tesis.



---

DR. med. RAQUEL GARZA GUAJARDO,  
Subdirectora de Estudios de Posgrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme permitido terminar un proyecto más en mi vida profesional, por darnos la fortaleza a mi esposo y a mí en tiempos de adversidad.

A mi papá, por darme todo lo que necesité durante mi formación profesional y personal le debo mi éxito.

A mi mamá, por siempre estar allí cuando la necesité a pesar de la distancia sin usted no hubiera llegado hasta donde estoy.

A mi hermana, para que le sirva de fuente de inspiración para que nunca le digan que hay algo imposible de hacer.

A mi amado esposo, por siempre estar cuando te necesito, por amarme, por estar motivándome a superarme a ti te agradezco con la vida por estar a mi lado.

A mis suegros y a toda la familia Cruz Vazquez y López Esquivel, por ayudarnos a su hijo y a mí en todos los aspectos posibles Dios los bendiga hoy y siempre.

A Robbi, por ser una gran amiga para mí, una fuente de apoyo cuando lo necesité, por todos tus consejos y ayuda.

A Álex, por toda tu ayuda profesional y amistad.

A la Dra Viviana por todo el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este proyecto, por sus palabras de ánimo, por inspirarme a seguir en la ciencia por ser un gran ejemplo en lo que quiero hacer con mi vida.

A mi comisión de tesis (Dr. Román, Dra Herminia) gracias por sus consejos y la ayuda que me brindaron estoy enormemente agradecida con ustedes.

A la Facultad de Medicina por permitirme realizar esta etapa de mi vida.

A el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por abrirme sus puertas.

A Juany, Ariadna por todo el apoyo brindado al inicio de la maestría gracias por toda la ayuda que nos brindaron a mi papá, esposo y a mí Dios las bendiga hoy y siempre sin su ayuda no hubiera podido terminar el primer semestre.

A el resto de las secretarías (Norma, Cristy, Lulú, Angi, Ira) gracias por las palabras que me brindaron.

A Don Lalo por toda la ayuda y palabras de motivación.

A CONACYT por el apoyo económico proporcionado durante la maestría

*A Dios, mi familia, y por sobre todo a mi piu les dedico este trabajo.*

*Es sólo a través del trabajo y del esfuerzo doloroso, por la energía sombría y el valor resuelto, que  
pasamos a cosas mejores.-Theodore Roosevelt.*

## ÍNDICE

### CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1	Enfermedad de Alzheimer	1
1.2	Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer	2
1.3	Síntomas y etapas de la Enfermedad de Alzheimer	4
1.4	Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer	6
1.5	Genética de la Enfermedad de Alzheimer	7
1.6	Características histopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer	10
1.6.1	Ovillos neurofibrilares	10
1.6.2	Tau	11
1.6.3	Placas amiloides	14
1.6.3.1	Placas difusas	15
1.6.3.2	Placas primitivas	15
1.6.3.3	Placas clásicas (neuríticas)	16
1.6.3.4	Placas "burned-out"	16
1.6.4	Proteína Precursora de Amiloide (PPA)	16
1.6.4.1	Gen APP	18
1.6.4.2	Mutaciones del gen APP	19
1.6.4.3	Procesamiento de APP (Via amiloidogénica y no amiloidogénica)	20
1.7	Hipótesis de la Cascada Amiloide	22
1.8	Péptido $\beta$ -Amiloide	23
1.8.1	Papel fisiológico del péptido A $\beta$	25
1.8.2	Proceso de agregación del péptido A $\beta$	27
1.8.3	Oligómeros del péptido A $\beta$	29
1.8.4	Péptido A $\beta$ 25-35	29
1.8.5	Péptido A $\beta$ 1-40	31
1.8.6	Péptido A $\beta$ 1-42	32
1.8.7	Técnicas de estudio de A $\beta$	32
1.8.7.1	ThT y ThS	35
1.8.7.2	ANS	37
1.9	Estrés oxidativo y la Enfermedad de Alzheimer	37
1.9.1	Metionina y estrés oxidativo	40
1.10	Inhibidores de la agregación	42



<b>CAPITULO II</b>		44
2.1	Justificación	44
	Hipótesis	44
<b>CAPITULO III</b>	<b>OBJETIVOS</b>	45
<b>CAPITULO IV</b>	<b>MATERIALES</b>	46
4.1	Reactivos	46
4.2	Materiales	46
4.3	Equipos	48
<b>CAPITULO V</b>	<b>MÉTODOS</b>	49
<b>CAPITULO VI</b>	<b>RESULTADOS</b>	66
<b>CAPITULO VII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	89
<b>CAPITULO VIII</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	92
<b>CAPITULO IX</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	97
<b>CAPITULO X</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	98

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EOFAD</b>	Enfermedad de Alzheimer Familiar de Inicio Temprano
<b>LOAD</b>	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío
<b>A<math>\beta</math></b>	Beta amiloide
<b>NFT</b>	Ovillos neurofibrilares
<b>MAP</b>	Proteína asociada a microtúbulos
<b>NAC</b>	Componente no amiloide
<b>PPA</b>	Proteína precursora del amiloide
<b>sPPA<math>\alpha</math></b>	Fragmento soluble de la proteína precursora del amiloide generado por alfa secretasa
<b>ACID</b>	Dominio intracelular de la proteína precursora de amiloide
<b>LTP</b>	Potencial de largo término
<b>GFLD</b>	Dominio tipo factor de crecimiento
<b>CuBD</b>	Dominio de unión a cobre
<b>AcD</b>	Dominio ácido
<b>CAPDD</b>	Dominio central de la proteína precursora del amiloide
<b>JMR</b>	Región juxtamembrana
<b>TM</b>	Hélix transmembrana

<b>CAA</b>	Angiopatía cerebral amiloide
<b>CTF<math>\beta</math></b>	Fragmento Carboxilo terminal de beta amiloide
<b>PS1/2</b>	Presenilina $\frac{1}{2}$
<b>BACE1/2</b>	Enzima de corte de la proteína precursora del amiloide de sitio beta.
<b>Kd</b>	Kilo Dalton
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ADDLs</b>	Ligandos difusibles derivados del beta amiloide
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>ThS</b>	Tioflavina S
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ANS</b>	Ácido 8-anilinaftalen-1-sulfónico
<b>SOD</b>	Super óxido dismutasa
<b>AGE</b>	Productos terminales de glicosilación avanzada
<b>RAGE</b>	Receptor de Productos terminales de glicosilación avanzada
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poli insaturados
<b>HINE</b>	Hidroxinonenal
<b>8'-OHdG</b>	8'Hidroxi-2'desoxiguanosina
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustración que ejemplifica cómo avanza el grado de afectación en el cerebro de una persona con Alzheimer y cómo se correlaciona con la etapa de la enfermedad.....6
- Figura 2:** Inmunohistoquímica de campo claro que demuestra a Tau reaccionando con los ovillos neurofibrilares en cerebro de paciente con EA (flechas negras) y las placas neuríticas (flecha blanca) (35).....11
- Figura 3:** Esquema representativo de la proteína Tau ejerciendo función MAP (38).....12
- Figura 4:** Fosforilación de Tau (41).....13
- Figura 5:** Secuencia aminoacídica de la isoforma mas larga de Tau (411 aminoácidos) (46).....14
- Figura 6:** Corte histológico teñido con rojo congo que muestra en el centro de la imagen un depósito de sustancia amiloide rodeado de células de la microglía que constituye una placa senil cortical (x400) (48).....15
- Figura 7:** Depósito de sustancia amiloide formada por una red de filamentos sin neuritas degeneradas ni zona central de amiloide condensado (49).....15
- Figura 8:** Corte histológico teñido con Bielschowsky que muestra placas seniles distróficas en el neurópilo (x500) (50).....16
- Figura 9:** Sección de tejido de un caso de EA impregnada con un método de plata de Bielschowsky modificado. En el centro se observa una placa neurítica. Esta es una lesión compleja que contiene amiloide, procesos neuríticos distróficos y células gliales reactivas (51).....16
- Figura 10:** Esquema del procesamiento de PPA por acción de la alfa y beta secretasas generando distintos productos protéicos (53).....17

<b>Figura 11:</b> Esquema estructural de la Proteína Precursora del Amiloide (58).....	18
<b>Figura 12:</b> Mutaciones reportadas hasta la fecha en el gen PPA y la relación con la secuencia de aminoácidos del péptido A $\beta$ (67).....	20
<b>Figura 13:</b> Diagrama de la Hipótesis del Amiloide estipula que el corte proteolítico de PPA genera al péptido beta miloide y es el factor desencadenante de la demencia en la enfermedad (79).....	23
<b>Figura 14:</b> Proceso esquematizado de la cinética de agregación de A $\beta$ la cual consta de dos etapas una denominada nucleación donde los primeros monómeros con estructura alfa hélice cambian a beta plegada reclutando e induciendo nuevos monómeros los cuales en la etapa de elongación aumentan su longitud culminando en la formación de las fibrillas (101).....	28
<b>Figura 15:</b> Esquema representativo de la conformación de A $\beta$ (25-35) de estructura beta plegada (113).....	31
<b>Figura 16:</b> Esquema del empleo de distintas técnicas para el estudio de agregados amiloides usando ThT como sonda fluorescente. (a) estructura química de ThT ,(b) microscopia electrónica de una placa senil, (c) microscopia de fluorescencia de una placa amiloide,(d) espectro de fluorescencia de ThT sola y unida a fibrillas, (e) cinética de agregación de beta amiloide con ThT(139).....	32
<b>Figura 17:</b> Estructura química del ANS.....	37
<b>Figura 18:</b> Esquema del mecanismo de generación de radicales libres de la Metionina 35 de A $\beta$ (159) .....	41
<b>Figura 19:</b> Esquema de generación de ERO por A $\beta$ (161).....	42
<b>Figura 20:</b> Diagrama de flujo para la cinética de agregación de A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes.....	51

<b>Figura 21:</b> Diagrama de flujo para la cinética de agregación de A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes.....	53
<b>Figura 22:</b> Diagrama de flujo para la cinética de agregación de las co-incubaciones de las mutantes agregadas con los péptidos silvestres.....	55
<b>Figura 23:</b> Diagrama de flujo para la cinética de agregación de las co-incubaciones de las mutantes con los péptidos silvestres agregados.....	55
<b>Figura 24:</b> Diagrama de flujo del ensayo de Viabilidad celular con MTS de los péptidos silvestres y mutantes en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.....	61
<b>Figura 25:</b> Diagrama de flujo del ensayo de producción de Especies Reactivas de Oxígeno de los péptidos silvestres y mutantes en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.....	64
<b>Figura 26:</b> Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ThS (agregados de tipo amiloide) para el fragmento A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes, todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF.....	66
<b>Figura 27:</b> Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ANS (agregados de tipo amorfo) para el fragmento A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes, todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF.....	67
<b>Figura 28:</b> Representación gráfica de la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo para el fragmento A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF normalizados. Pruebas estadísticas ANOVA y comparaciones múltiples significancia $p < 0.05$ .....	68
<b>Figura 29:</b> Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co incubado con la mutante A $\beta$ (25-35)A30W previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.....	69

<b>Figura 30:</b> Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co-incubado con la mutante A $\beta$ (25-35)K28A previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.....	70
<b>Figura 31:</b> Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co incubado con la mutante A $\beta$ (25-35)M35C previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre-mutante.....	70
<b>Figura 32:</b> Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre previamente agregado co-incubado con las mutantes A30W,K28A,M35C en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado-mutante.....	72
<b>Figura 33:</b> Gráfica de viabilidad celular de A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de muerte celular se empleo Rotenona a una concentración de 1 $\mu$ M.....	72
<b>Figura 34:</b> Gráfica de ERO A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de producción de ERO se empleo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a una concentración de 500 $\mu$ M.....	73
<b>Figura 35:</b> Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ThS (agregados de tipo amiloide) para el fragmento A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes, todos a una concentración de 40 $\mu$ M.....	74
<b>Figura 36:</b> Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ANS (agregados de tipo amorfo) para el fragmento A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes, todos a una concentración de 40 $\mu$ M.....	75
<b>Figura 37:</b> Representación gráfica de la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo para el fragmento A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF normalizados. Pruebas estadísticas ANOVA y comparaciones múltiples significancia p<0.05.....	76

**Figura 38:** Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co-incubado con la mutante A $\beta$ (1-40)A30W previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre-mutante.....77

**Figura 39:** Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co-incubado con la mutante A $\beta$ (1-40)K28A previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre-mutante.....77

**Figura 40:** Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co-incubado con la mutante A $\beta$ (1-40)M35C previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre-mutante. ....78

**Figura 41:** Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (1-40) silvestre previamente agregado co-incubado con las mutantes A30W,K28A,M35C en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado-mutante.....79

**Figura 42:** Gráfica de viabilidad celular de A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de muerte celular se empleó Rotenona a una concentración de 1  $\mu$ M.....79

**Figura 43:** Gráfica de ERO A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de producción de ERO se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 500  $\mu$ M.....81

**Figura 44:** Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ThS (agregados de tipo amiloide) para el fragmento A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M.....82

**Figura 45:** Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ANS (agregados de tipo amrfo) para el fragmento A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M.....83

**Figura 46:** Representación gráfica de la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo para el fragmento A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes todos a una



concentración de 40µM con valores de URF normalizados. Pruebas estadísticas ANOVA y comparaciones múltiples significancia  $p > 0.05$ .....84

**Figura 47:** Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido Aβ(1-42) silvestre co-incubado con las mutantes A30W,K28A,M35C previamente agregadas en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado/ mutante.....85

**Figura 48:** Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido Aβ(1-42) silvestre previamente agregado co-incubado con las mutantes A30W,K28A,M35C en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado/ mutante.....86

**Figura 49:** Gráfica de viabilidad celular de Aβ(1-42) silvestre y mutantes a una concentración de 40µM. Control de muerte celular se empleó Rotenona a una concentración del 1 µM.....87

**Figura 50:** Gráfica de ERO Aβ(1-42) silvestre y mutantes a una concentración de 40µM. Control de producción de ERO se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración del 500 µM .....88

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Prevalencia estimada de la demencia en personas de 60 años o mayores, estandarizada a la población de Europa Occidental por región Carga Mundial de Morbilidad.....	3
<b>Tabla 2:</b> Población total mayor de 60, prevalencia preliminar estimada para la demencia (2010), número estimado de personas con demencia (2010,2030 y 2050) e incrementos proporcionales (2010-2030 y 2010-2050) por región mundial GBD (Carga mundial de morbilidad).....	4
<b>Tabla 3:</b> Genes asociados a la forma familiar de la Enfermedad de Alzheimer. (25).....	8
<b>Tabla 4:</b> Genes asociados a la Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío de acuerdo a estudios de GWAS (32).....	10
<b>Tabla 5:</b> Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y sus respectivas mutantes empleados para las cinéticas de agregación empleando ThS.....	47
<b>Tabla 6:</b> Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y sus respectivas mutantes empleados para las cinéticas de agregación empleando ANS.....	51
<b>Tabla 7:</b> Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y sus respectivas mutantes (agregadas) empleadas en cada experimento de co-incubación.....	53
<b>Tabla 8:</b> Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestres agregados y sus respectivas mutantes en cada experimento de co-incubación.....	56
<b>Tabla 9:</b> Lista de los tratamientos empleados en los ensayos de viabilidad celular.....	59
<b>Tabla 10:</b> Lista de los tratamientos empleados en los ensayos de especies reactivas de oxígeno.....	62

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Enfermedad de Alzheimer**

La demencia es un síndrome adquirido el cual se caracteriza por la pérdida y/o disminución gradual y progresiva de la memoria y de las habilidades cognitivas. Ésta conlleva a la disminución del nivel intelectual de una persona y dependiendo del grado de afectación, interfiere en la realización de actividades cotidianas debido al alto grado de incapacidad y dependencia que genera el padecimiento en el individuo. A nivel mundial se estima que la Enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia y que contribuye en un 60 a 70% del total de los casos (1).

Alois Alzheimer reportó por primera vez en 1906 un estudio clinicopatológico de una mujer de edad avanzada que presentaba un cuadro clínico "atípico" de demencia. Correlacionó el comportamiento y la pérdida de ciertas habilidades cognitivas de la mujer con hallazgos histopatológicos de lesiones en forma de semillas de mijo y fibrillas depositadas en el córtex del cerebro después de la muerte de la paciente (2).

Hoy en día la prevalencia de la Enfermedad de Alzheimer se estima que sea aproximadamente de 24 millones de pacientes en el mundo y se predice que se cuadruplique esta cantidad para el año 2050 teniendo un costo elevado, (cercano a 172 mil millones de dólares por año sólo en Estados Unidos), según las proyecciones del estudio realizado por Ganguli y colaboradores (3).

Se ha descrito a la Enfermedad de Alzheimer como una enfermedad de gran heterogeneidad la cual resulta de la combinación de factores tanto ambientales como genéticos. Sin embargo hasta la fecha uno de los principales factores de riesgo es la edad avanzada (4). También se han descrito otros factores de riesgo en los cuales se han incluido: la hipertensión, uso de anticonceptivos, fumar, enfermedades del corazón, depresión, artritis y diabetes (5). Así también se han asociado ciertos estilos de vida que disminuyen el riesgo de padecer EA los cuales son: ejercicio, la estimulación intelectual e incluso llevar ciertos

estilos de alimentación destacando aquellos donde se ingieren alimentos ricos en productos del mar (6).

## **1.2 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer**

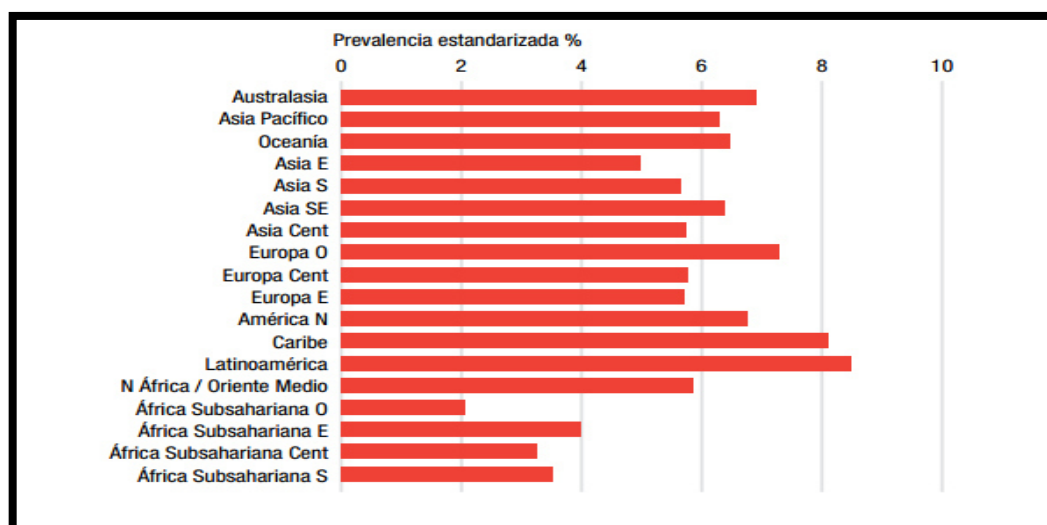
La prevalencia mundial de EA basada en datos epidemiológicos de Ganguli y colaboradores estima que hay 24.3 millones de individuos que presentan demencia hoy en día, con 4.6 millones de casos nuevos de demencia que se reportan cada año. Se estima que el número de afectados se aumentará a 81.1 millones para el año 2040 (7 - 8).

La mayoría de las personas que tienen demencia viven en países en vías de desarrollo, en donde países como China así como sus alrededores presentan un gran número de casos de personas con demencia (6 millones), seguidos por la Unión Europea (5 millones), EUA (2.9 millones), e India (1.5 millones) (9).

Los datos obtenidos en estudios de poblaciones en Europa, sugieren que la edad con mayor prevalencia de personas con Alzheimer es de 65 años en un 4.4% y para personas con demencia la misma edad pero con un 6.4%, esto de acuerdo a un estudio poblacional realizado por Breteler y colaboradores (10). Pocos estudios epidemiológicos de demencia y la Enfermedad de Alzheimer en países de escasos recursos han sido efectuados, Hall y colaboradores estimaron una prevalencia general de 3.4% del Alzheimer en países en vías de desarrollo (11).

La incidencia global anual de demencia es alrededor de 7.5 por cada 1000 personas. La mayoría de los estudios sobre la incidencia de la enfermedad de Alzheimer han sido realizados en EEUU y Europa, hay algunos en Japón y muy pocos en países como China, India, Nigeria, Brasil y otros; por lo tanto los datos a nivel mundial son más precisos en algunas zonas que en otras e incluso hay países donde no hay estudios de esta índole (12).

Tabla 1: Prevalencia estimada de la demencia en personas de 60 años o mayores, estandarizada a la población de Europa Occidental por región Carga Mundial de Morbilidad.



En aquellos países de altos ingresos la incidencia es mayor, siendo EEUU el país con la cifra más alta con un 2.06% de incidencia anual, seguida de Europa con 1.51%. Según el sexo la incidencia anual de EA fue ligeramente superior entre las mujeres con un 1.37%, que en los hombres (1.06%). Respecto a la edad, en Europa la incidencia en personas con edades entre 60 a 64 años es de 0.9%, a un 18% en personas entre 90 y 94 años. El pico de incidencia varía en los diferentes países, situándose en EEUU y Europa entre 80 a 89 años, en Asia entre 75 y 84 años y en África entre 70 y 79 años esto de acuerdo al reporte emitido por la Organización Mundial de la Salud (13).

Alrededor del mundo la incidencia de la demencia aumenta exponencialmente con la edad y la cifra de personas con la Enfermedad de Alzheimer se duplica conforme aumenta la esperanza de vida. De acuerdo a la OMS se estima que cada 4 segundos aparece un nuevo caso de demencia en el mundo y anualmente aparecen 7.7 millones. De esos 7.7 millones, unos 3.6 millones (46%) casos se producen en Asia, 2.3 millones (31%) en Europa, 1.2 millones (16%) en América y EEUU y 0.5 millones (7%) en África (14).

Las personas viven varios años tras detectarles demencia, la supervivencia media se estima entre 4 a 6 años, siendo de vital importancia contar con el apoyo apropiado para que puedan tener una buena calidad de vida. Los sectores de salud de algunos países han empezado a desarrollar estrategias nacionales para disminuir la incidencia, esto es importante ya que se estima que la prevalencia de la enfermedad se dispare durante este siglo debido al aumento de la esperanza de vida (15).

Tabla 2: Tabla 2: Población total mayor de 60 años, prevalencia preliminar estimada para la demencia (2010), número estimado de personas con demencia (2010,2030 y 2050) e incrementos proporcionales (2010-2030 y 2010-2050) por región mundial GBD (Carga mundial morbilidad)

Región GBD (Carga Mundial de Morbilidad)	Población mayor de 60 (millones)	Prevalencia preliminar estimada (%)	Número de personas con demencia (millones)			Incrementos proporcionales (%)	
	2010	2010	2010	2030	2050	2010-2030	2010-2050
<b>ASIA</b>	<b>406,55</b>	<b>3,9</b>	<b>15,94</b>	<b>33,04</b>	<b>60,92</b>	<b>107</b>	<b>282</b>
Australasia	4,82	6,4	0,31	0,53	0,79	71	157
Asia Pacífico	46,63	6,1	2,83	5,36	7,03	89	148
Oceanía	0,49	4,0	0,02	0,04	0,10	100	400
Asia central	7,16	4,6	0,33	0,56	1,19	70	261
Asia oriental	171,61	3,2	5,49	11,93	22,54	117	311
Asia meridional	124,61	3,6	4,48	9,31	18,12	108	304
Sudeste asiático	51,22	4,8	2,48	5,30	11,13	114	349
<b>EUROPA</b>	<b>160,18</b>	<b>6,2</b>	<b>9,95</b>	<b>13,95</b>	<b>18,65</b>	<b>40</b>	<b>87</b>
Europa occidental	97,27	7,2	6,98	10,03	13,44	44	93
Europa central	23,61	4,7	1,10	1,57	2,10	43	91
Europa oriental	39,30	4,8	1,87	2,36	3,10	26	66
<b>LAS AMÉRICAS</b>	<b>120,74</b>	<b>6,5</b>	<b>7,82</b>	<b>14,78</b>	<b>27,08</b>	<b>89</b>	<b>246</b>
Norteamérica	63,67	6,9	4,38	7,13	11,01	63	151
Caribe	5,06	6,5	0,33	0,62	1,04	88	215
Latinoamérica andina	4,51	5,6	0,25	0,59	1,29	136	416
Latinoamérica central	19,54	6,1	1,19	2,79	6,37	134	435
Latinoamérica meridional	8,74	7,0	0,61	1,08	1,83	77	200
Latinoamérica tropical	19,23	5,5	1,05	2,58	5,54	146	428
<b>ÁFRICA</b>	<b>71,07</b>	<b>2,6</b>	<b>1,86</b>	<b>3,92</b>	<b>8,74</b>	<b>111</b>	<b>370</b>
Norte de África / Oriente Medio	31,11	3,7	1,15	2,59	6,19	125	438
África Subsahariana central	3,93	1,8	0,07	0,12	0,24	71	243
África Subsahariana oriental	16,03	2,3	0,36	0,69	1,38	92	283
África Subsahariana meridional	4,66	2,1	0,10	0,17	0,20	70	100
África Subsahariana occidental	15,33	1,2	0,18	0,35	0,72	94	300
<b>MUNDO</b>	<b>758,54</b>	<b>4,7</b>	<b>35,56</b>	<b>65,69</b>	<b>115,38</b>	<b>85</b>	<b>225</b>

### 1.3 Síntomas y etapas de la Enfermedad de Alzheimer

Los síntomas de EA incluyen pérdida de memoria, dificultad para encontrar palabras, desorientación general, así como cambios de comportamiento y personalidad, los cuáles se van desarrollando de manera gradual o pueden tener un inicio abrupto como lo es en el caso de la forma familiar de EA (16). Uno de los síntomas iniciales de EA es el fallo de la memoria reciente, y a medida que progresa la enfermedad se empiezan a afectar las habilidades

cognitivas del individuo tales como el lenguaje, razonamiento e inclusive cambios en la personalidad.

La enfermedad de Alzheimer presenta una evolución clínica que se divide en cuatro etapas:

**Alzheimer temprano:** La enfermedad de Alzheimer tiene un inicio temprano cuando afecta a una persona menor de 65 años, no es muy común y menos del 5% de la población general la padece; se caracteriza por seguir una herencia de tipo mendeliana (17).

**Alzheimer leve:** esta etapa de la enfermedad se ve marcada por fallos en la memoria de corto plazo, sin embargo, estos problemas no son evidentes para el individuo afectado, ni en los exámenes médicos (18).

**Alzheimer moderado:** En esta etapa, los individuos presentan fallos en la memoria, son incapaces de recordar hechos y/o situaciones cotidianas. Por lo general, todavía pueden recordar detalles significativos sobre sí mismos y sus familiares, aún pueden vestirse y asearse por su cuenta (19).

**Alzheimer severo:** Los problemas de la memoria empeoran, incluso desarrollan cambios drásticos de personalidad, es en esta etapa donde los individuos afectados por la enfermedad necesitan considerable ayuda en las actividades de la vida cotidiana. En la última etapa de esta enfermedad los individuos pierden la capacidad de responder a su entorno, de hablar y, eventualmente de controlar sus movimientos. Es posible que todavía pronuncien palabras o frases. En esta etapa, los individuos necesitan ayuda con la mayoría de su cuidado personal diario, incluyendo comer y hacer sus necesidades (20).

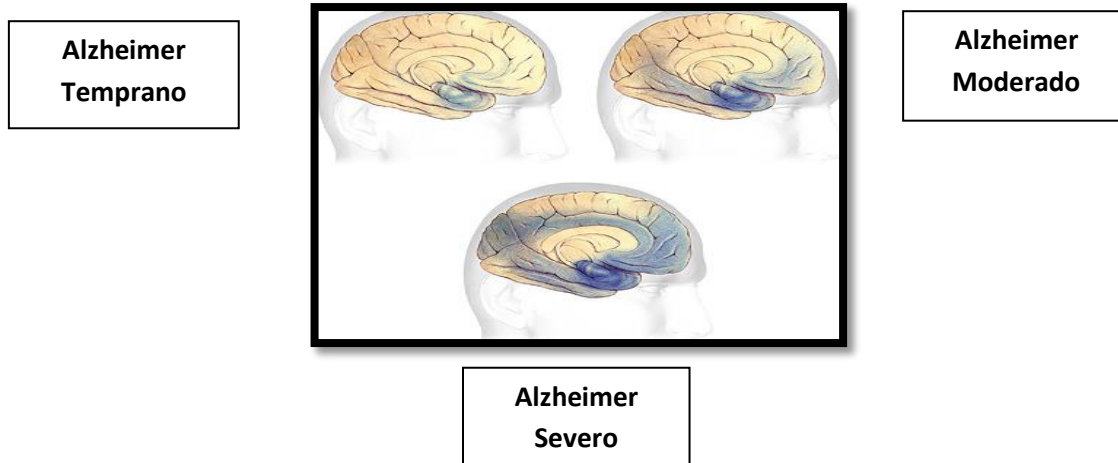


Figura 1: Ilustración que ejemplifica cómo avanza el grado de afectación en el cerebro de una persona con Alzheimer y cómo se correlaciona con la etapa de la enfermedad. Figura adaptada de la Sociedad de Alzheimer basada en el sistema desarrollado por Barry Reisberg, M.D., director del Centro de Investigación de Demencia y Envejecimiento Silberstein de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York.

#### 1.4 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer se puede clasificar en distintos tipos, según en base a qué hagamos la referencia. Si la clasificamos de acuerdo a la edad de inicio, la EA puede ser:

- **Presenil o temprana o de inicio precoz**, la cual tiene un patrón de herencia familiar. Comienza antes de los 65 años, es de curso más rápido y **no supera el 1% del total de casos** (21).
- **Senil o tardía**, de inicio tardío, aparece después de los 65 años, en su mayor parte es esporádica y de curso lento. Este tipo representa la mayoría de los casos (21).

Otra forma de clasificación es según la implicación que tenga el factor genético, la EA puede ser:

- **Familiar**: La causa es la alteración en algunos genes que se heredan de forma dominante produciendo alteraciones similares en los descendientes que van a provocar EA. Este tipo se debe principalmente



a alteraciones en tres genes principalmente: el gen de la Proteína Precursora del Amiloide (PPA) situado en el cromosoma 21; el gen de la Presenilina 1 (PS1), en el cromosoma 14; y el gen de la Presenilina 2 (PS2); en el cromosoma 1 (21, 22).

- **Esporádica:** comienza en personas mayores de 65 años y es el **tipo más común**. Su causa es aún desconocida, aunque se han descrito distintos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad, como es la presencia del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE), localizado en el cromosoma 19 (21, 22).

### **1.5 Genética de la Enfermedad de Alzheimer**

Después de la edad avanzada, la genética es el segundo mayor factor de riesgo en EA. La EA es considerada como una enfermedad genética la cual puede presentarse en dos formas: familiar de inicio temprano caracterizada por un patrón de herencia Mendeliana (EOFAD por sus siglas en inglés), y la de inicio tardío (inicio de los síntomas edad >60) sin un patrón de transmisión genética (LOAD por sus siglas en inglés), (Bertram and Tanzi 2005; Tanzi and Bertram 2005) (23).

#### **Genes asociados con Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano**

La Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano(EOFAD) tiene su origen en mutaciones raras de alta penetrancia en 3 diferentes genes; el gen de la Proteína Precursora del Amiloide (PPA) ubicada en el cromosoma 21, el gen de la presenilina-1 (PS-1) (cromosoma 14), y el gen de la presenilina-2 (PS-2) (cromosoma 1). Las personas que padecen síndrome de Down, casi siempre desarrollan EA a una edad temprana, esto probablemente debido a que tienen tres ejemplares del cromosoma 21 donde se ubica el gen PPA (24).

Tabla 3: Genes asociados a la forma familiar de la Enfermedad de Alzheimer (25).

Gen	Proteína	Cromosoma	Mutaciones	Fenotipo
<b>PPA</b>	Proteína precursora de A $\beta$	21q21	24(duplicación)	Aumenta la proporción A $\beta$ (42)/ A $\beta$ (40)
				Aumenta la producción de A $\beta$
<b>PSEN1</b>	Presenilina 1	14q24	185	Aumenta la agregación de A $\beta$
<b>PSEN2</b>	Presenilina 2	1q31	14	Aumenta la proporción A $\beta$ (42)/ A $\beta$ (40)
				Aumenta la proporción A $\beta$ (42)/ A $\beta$ (40)

### Genes asociados con Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

El Alzheimer de inicio tardío (LOAD) es la forma más común de la enfermedad y es definido por la edad de inicio mayor a 60 años. Mientras que EOFAD se caracteriza por una herencia de tipo Mendeliana en forma autosómica-dominante, para LOAD se observa un patrón genético de herencia complejo en donde tanto los factores ambientales, genéticos y estilo de vida convergen para determinar el riesgo de padecer EA (26). La única variante génica considerada y establecida como factor de riesgo de LOAD es el alelo  $\epsilon$ 4 del gen de la apolipoproteína E (APOE) localizada en el cromosoma 19, tiene tres variantes, E2, E3 y E4. El tipo E4 aumenta el riesgo de desarrollar EA y el E2 probablemente disminuye el riesgo y es más bien un agente protector. Sin embargo, muchas personas con EA no tienen el gen tipo E4 y muchas otras con dicho gen, no tienen EA (27). La identificación de APOE como un gen candidato

de EA se llevó a cabo mediante estudios de ligamiento génico en el cromosoma 19 seguido del descubrimiento de que apoE se une a A $\beta$  en líquido cefalorraquídeo (28). Debido a que se hereda un ejemplar de cada gen de cada uno de los progenitores, todos tenemos dos ejemplares del gen APOE aquellos que tienen dos copias del APOE4 están expuestos a un riesgo mayor de desarrollar la EA, pero no todas las personas con dos APOE4 desarrollarán la enfermedad.

Mientras que en EOFAD las mutaciones en los genes (PPA, PSEN1 y PSEN2) son suficiente para el desarrollo de EA, pero no necesariamente causan EA, el alelo  $\epsilon$ 4 de APOE no es suficiente para causar EA, sin embargo, ha sido asociado como factor de riesgo de la enfermedad que disminuye la edad de inicio de EA en forma dosis-dependiente. Funcionalmente, APOE normalmente tiene un papel en el metabolismo y transporte de lípidos, sin embargo, en EA se asocia con la depuración de A $\beta$  en el cerebro (29).

Es probable que haya muchos otros genes que aumenten el riesgo de desarrollar la EA, pero el porcentaje de riesgo asociado con cada uno de estos genes será probablemente, menor que el asociado con APOE. Algunos investigadores han encontrado otros genes posiblemente asociados con la EA, donde se incluye una leve modificación en PS-1 (30), el gen de la butirilcolinesterasa E, la Enzima Convertidora de Angiotensina (31), una región del cromosoma 12 y otra del cromosoma 10. Hasta ahora, ninguno de estos genes ha sido definitivamente ligado a la EA.

Tabla 4: Genes asociados a la Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío de acuerdo a estudios de GWAS (32).

Gen	Proteína	Cromosoma	Factor de riesgo	de Fenotipo Propuesto
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E	19q13	~400-1500%	Depuración de A $\beta$ /Metabolismo de lípidos
<b>CD33</b>	Cd33	19q13.3	~10%	Degradación de A $\beta$ /Inmunidad inata
<b>CLU</b>	Clusterina	8p21.1	~10%	Depuración de A $\beta$ /Inmunidad inata
<b>CR1</b>	Receptor 1 del componente del complemento	1q32	~15%	Depuración de A $\beta$ /Inmunidad inata
<b>ATX1</b>	Ataxina 1	6p22.3	NA	Producción de A $\beta$

## 1.6 Características histopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer

Los rasgos histopatológicos que definen a la Enfermedad de Alzheimer son las placas amiloides extracelulares compuestas en su mayoría del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), los ovillos o marañas neurofibrilares (NFTs), que se encuentran de manera intracelular en el cerebro y agregados de la proteína asociada a microtúbulos Tau hiperfosforilada en proporción anómala (33).

### 1.6.1 Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT) son agregados intraneuronales filamentosos de la proteína asociada a microtúbulos Tau que se encuentra hiperfosforilada de

manera anómala. Además de los ya conocidos cambios en el estado de Fosforilación de Tau, esta además sufre múltiples terminaciones y cambios conformacionales donde el monómero sin plegar se transforma a una estructura polimérica característica de los NFT. Se ha encontrado que cortes en los extremos amino y carboxilo terminal de Tau influyen directamente la conformación y el plegamiento aumentando la capacidad de polimerizar y formar fibrillas, estos cortes pueden ser resultado de corte proteolítico por acción de caspasas como parte de una cascada apoptótica (34).



Figura 2: Inmunohistoquímica de campo claro que demuestra a Tau reaccionando con todas los ovillos neurofibrilares en cerebro de paciente con EA (flechas negras) y las placas neuríticas (flecha blanca) (35).

### 1.6.2 Tau

La proteína Tau del cerebro humano consiste en una familia de seis proteínas derivadas de un solo gen, localizado en el cromosoma 17q21, las cuáles son producto del empalme alternativo en el procesamiento del ARN mensajero (36). Estas proteínas difieren entre sí por contener tres o cuatro repeticiones del dominio de unión a tubulina (37).

Tau es en una proteína neuronal asociada a microtúbulos (MAP), una de sus funciones es la estabilización de los microtúbulos en los axones. Otras funciones asociadas a la proteína Tau involucran un papel en la transducción de señales, en la interacción con la actina en el citoesqueleto, favorece el crecimiento de neuritas, interacciones con la membrana plasmática anclando

enzimas como cinasas y fosfatasas así como la regulación del transporte de vesículas intracelulares (39).

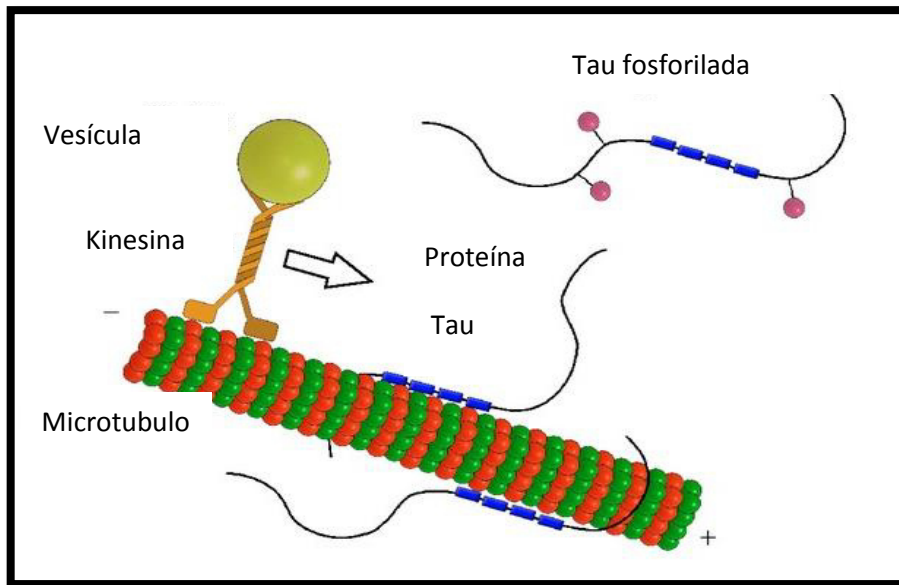


Figura 3: Esquema representativo de la proteína Tau ejerciendo función MAP (38).

Entre las características químicas de Tau se puede destacar que ésta es altamente soluble, es resistente al calor y a la desnaturalización por agentes químicos o tratamientos con ácidos sin que pierda su función biológica principal (la unión de los microtúbulos y estimular su ensamblaje) por lo que resulta contradictorio pensar que una proteína tan resistente forme agregados insolubles y más aún que los mecanismos moleculares por los cuales se originan estos agregados no sean totalmente conocidos hasta el momento (40).

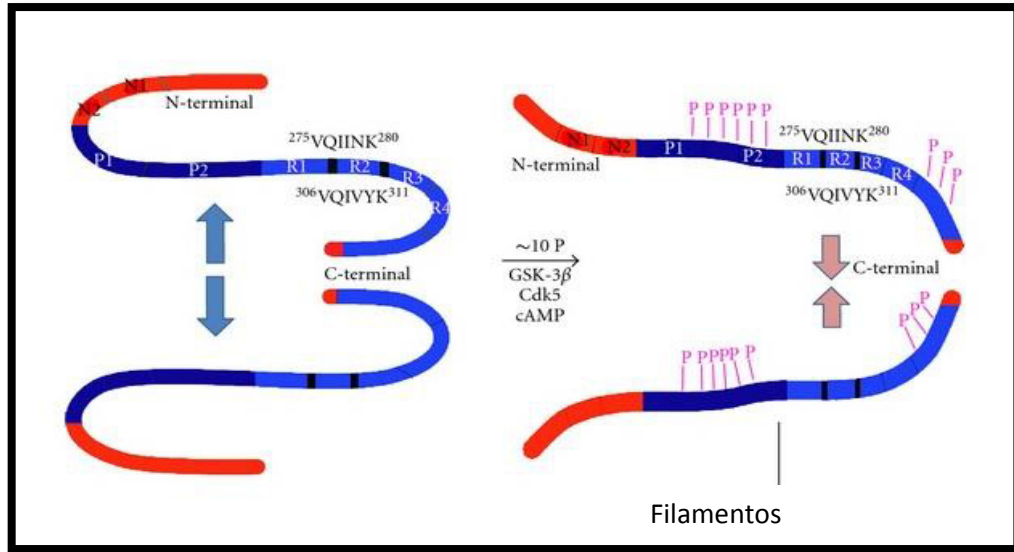


Figura 4: Fosforilación de Tau (41).

El principal mecanismo por el cual Tau forma agregados insolubles es una hiperfosforilación post-traducciona, la cual ocasiona que los microtúbulos se desensamblen y, falle el transporte axonal comprometiendo la actividad neuronal y la función sináptica (42). La hiperfosforilación anormal de Tau parece preceder a su acumulación en las neuronas afectadas en EA. La proteína Tau hiperfosforilada fue descubierta no solamente en los ovillos neurofibrilares (NFT) sino que también en el citosol de pacientes con EA (43). Una de las posibles explicaciones de la hiperfosforilación anómala de Tau puede deberse a cambios conformacionales los cuáles son un mejor sustrato para la fosforilación y/o peor sustrato para la desfosforilación. Davies y colaboradores desarrollaron una serie de anticuerpos monoclonales para detectar estas alteraciones conformacionales en pacientes con EA (44). En cerebros de pacientes con EA los niveles de Tau, pero no el ARN mensajero de la proteína, se encuentran de 4 a 8 veces más, comparados con los controles y este aumento es de la forma anormalmente hiperfosforilada (45).



Figura 5: Secuencia aminoacídica de la isoforma más larga de Tau (411 aminoácidos) (46).

### 1.6.3 Placas amiloides

Las placas son lesiones del neurópilo de estructura esferoide que miden aproximadamente 20-100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Además de la proteína  $\beta$ -amiloide, se han detectado muchas sustancias en ellas incluyendo amiloide sérico P, así como varias proteínas de fase aguda, factores de complemento, proteoglicanos, apolipoproteína e4, citocinas y una proteína no caracterizada llamada NAC (componente no amiloide) que deriva de la sinucleína (47).



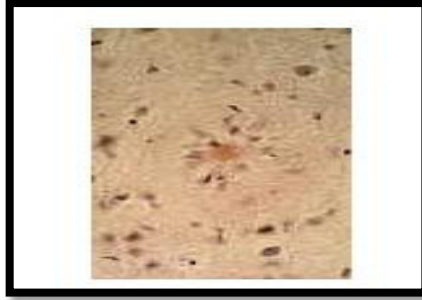


Figura 6. Corte histológico teñido con rojo congo que muestra en el centro de la imagen un depósito de substancia amiloide rodeado de células de la microglía que constituye una placa senil cortical (x400) (48).

#### 1.6.3.1 Placas difusas

Se le llama placa difusa por su apariencia poco demarcada y sin bordes delimitados. Están formadas por una delicada red de finas fibrillas de filamentos de amiloide, sin neuritas degeneradas ni zona central de amiloide condensado (47).



Figura 7: Depósito de substancia amiloide formada por una red de filamentos sin neuritas degeneradas ni zona central de amiloide condensado (49).

#### 1.6.3.2 Placas primitivas

Están compuestas por depósitos extracelulares de A $\beta$  no fibrilar, tienen una distribución más extensa y son el subtipo más frecuente de placa. Este tipo de deposición temprana de A $\beta$  se presenta en ancianos sin síntomas clínicos de EA y en pacientes con Síndrome de Down. Las placas comienzan a aparecer en un neurópilo, el cual aparentemente se encuentra normal y preceden el desarrollo de otros componentes de la placa, tales como neuritas distróficas o células gliales reactivas. Por estos motivos, las placas primitivas representan

los cambios morfológicos más tempranos en la secuencia patogénica de la EA (47).

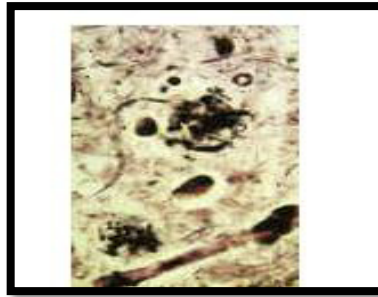


Figura 8: Corte histológico teñido con Bielschowsky que muestra placas seniles distróficas en el neurópilo (x500) (50).

#### **1.6.3.3 Placas clásicas (neuríticas)**

Están presentes en los estadios más avanzados de la enfermedad. Es un foco complejo de degeneración del neurópilo que contiene una región central de amiloide rodeada por astrocitos reactivos, microglía y neuritas distróficas que corresponden a dendritas y axones degenerados (47).

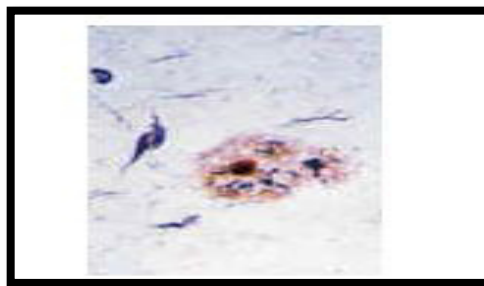


Figura 9: Sección de tejido de un caso de EA impregnada con un método de plata de Bielschowsky modificado. En el centro se observa una placa neurítica. Esta es una lesión compleja que contiene amiloide, procesos neuríticos distróficos y células gliales reactivas (51).

#### **1.6.3.4 Placas "burned-out"**

Representan el estado terminal de la evolución de una placa específica en la que ha desaparecido el componente celular, sólo contienen una zona central de amiloide condensado (47).

#### 1.6.4 Proteína Precursora de Amiloide (PPA)

La Proteína Precursora del Amiloide (PPA) es la molécula más investigada en la patogénesis de EA, es una proteína transmembrana que se expresa de manera ubicua en el organismo y que constantemente es procesada en fragmentos más pequeños. El fragmento largo ectoplasmático y soluble PPA $\alpha$  (sPPA $\alpha$  generado por la alfa secretasa) presenta efectos neurotróficos, el fragmento más pequeño es el péptido  $\beta$ -amiloide (producto de la beta y gamma secretasas) es asociado al origen de la patogenia en EA, mientras que el dominio intracelular de PPA (AICD) el cual es el producto de la actividad de la gamma secretasa, regula vías de señalización intracelulares y se asocia también con la patología de EA (52).

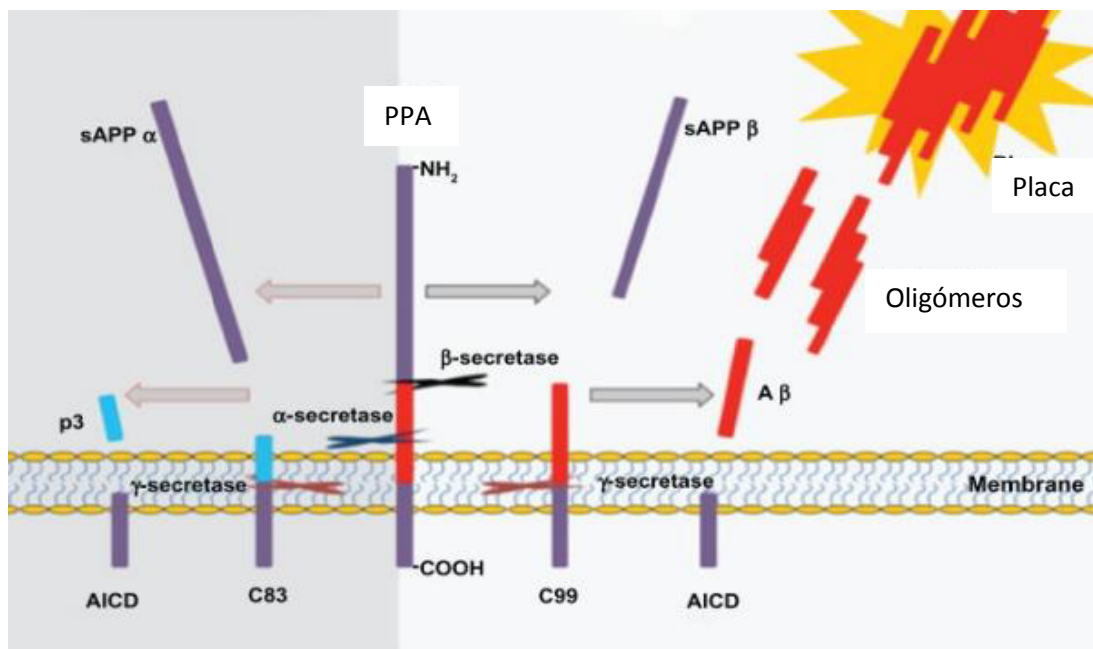


Figura 10: Esquema del procesamiento de PPA por acción de la alfa y beta secretasas generando distintos productos protéicos (53).

Las funciones fisiológicas de PPA aún no son totalmente esclarecidas, por lo contrario, el papel patológico de PPA está en gran medida casi elucidado (54). Estudios *in vitro* sugieren que PPA juega un papel importante en la migración celular y en la extensión neuronal. Mediante ensayos knockdown de PPA en el pez zebra se descubrió que la ausencia del gen PPA genera defectos durante la

reordenación tisular durante el desarrollo embrionario (55). La mayoría de los ensayos funcionales *in vivo* han sido realizados en ratones transgénicos a los cuáles se les ha deletado el gen PPA. La delección de PPA por si misma no causa letalidad, sin embargo, los animales muestran una serie de defectos fenotípicos sutiles tales como crecimiento estancado, peso del cerebro disminuido, y fallos en el LTP que pueden ser rescatados con la administración de sPPA $\alpha$  (56).

La estructura de PPA consta de un arreglo de múltiples dominios; el ectodominio de PPA consiste en varios subdominios o regiones funcionales que son nombradas: dominio tipo factor de crecimiento (GFLD por sus siglas en inglés), un dominio de unión a cobre (CuBD), un dominio ácido (AcD), el dominio central de PPA (CAPPD) y la región yuxtamembrana (JMR) seguida de una hélice transmembrana (TM) y el dominio intracelular de PPA (ACID) (57).

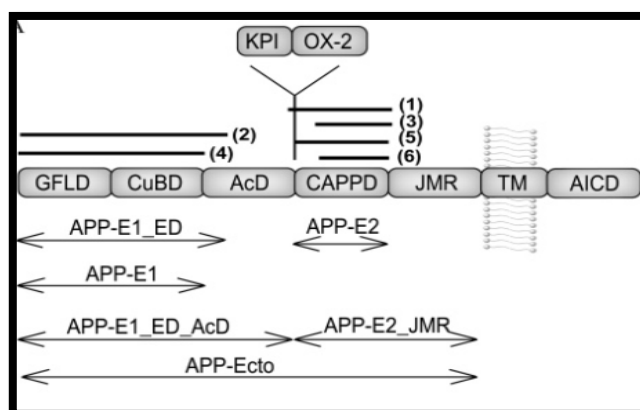


Figura 11: Esquema estructural de la Proteína Precursora del Amiloide (58).

#### 1.6.4.1 Gen PPA

Yoshikai et al. (1990) determinó que el gen PPA contiene 19 exones y mide aproximadamente 170kb. PPA tiene varias isoformas generadas por corte y empalme alternativo de los exones 1-13, 13a., y 14-18. (59) Los transcritos predominantes son PPA695 (exones 1-6, 9-18, no 13a), PPA751 (exones 1-7,9-18, pero no 13a) y PPA770 (exones 1-18 pero no exón 13a). Todos estos transcritos codifican proteínas multidominio las cuales tienen una región

anclada a la membrana celular. El péptido beta amiloide es codificado por los exones 16 y 17 del gen (59). Gran cantidad de evidencia indica que un aumento en la expresión del gen PPA es la causa de la demencia tipo Alzheimer, esto debido al aumento en la producción del producto proteico de 42 aminoácidos (A $\beta$ 42) el cuál es patogénico (Dermaut *et al.*, 2005) (60).

Desde hace tiempo se conoce que la sobre expresión del gen PPA en pacientes con Síndrome de Down conlleva a síntomas de demencia tipo Alzheimer en edades tempranas, esto seguido a la deposición de A $\beta$  y culminando en una neurodegeneración (Wisniewski *et al.*, 1985) (61). En estudios recientes, duplicaciones genómicas del locus PPA han sido reportadas en familias con enfermedad de Alzheimer de inicio temprano con angiopatía amiloidea cerebral (CAA), lo cual sugiere que un aumento en los niveles de expresión de PPA puede ocasionar demencia de tipo Alzheimer en ausencia de la trisomía 21 (62). También se ha sugerido que las variantes transcripcionales de PPA puedan estar relacionadas al mecanismo patogénico de la EA, en este respecto se han detectado mutaciones en el promotor de PPA en pacientes con EOAD, las cuales originan un aumento de hasta 2 veces en la actividad transcripcional *in vitro* de PPA (63).

#### **1.6.4.2 Mutaciones del gen PPA**

Se han reportado mutaciones del gen PPA que resultan en cambios en la secuencia aminoacídica de A $\beta$ . Algunas de estas mutantes de PPA son Dutch (E693Q), Flemish (A692G), Arctic (E693G), Italian (E693K), Iowa (N694D) y Piedmont (L705V). Estas mutaciones corresponden a cambios en los residuos 21, 22,23 y 34 del péptido beta amiloide (Revesz *et al.* 2009) (64). Se ha reportado en la población de Islandia una variante rara protectora en PPA (p.A673T) la cual se localiza cerca del sitio del corte proteolítico de la beta secretasa, el cual impide el corte de PPA originando una reducción del radio A $\beta$ <sub>1-40</sub>/ A $\beta$ <sub>1-42</sub> *in vitro*, y reduce el riesgo de EA (65). En otro caso, se reportó otra mutación en el mismo sitio (p.A673V), la cual resultó ser patogénica en un estado homocigoto pero protectora en heterocigotos, lo cual sugiere que una

mezcla del tipo silvestre y mutante de PPA afecta las propiedades de agregación de los péptidos de A $\beta$  (66).

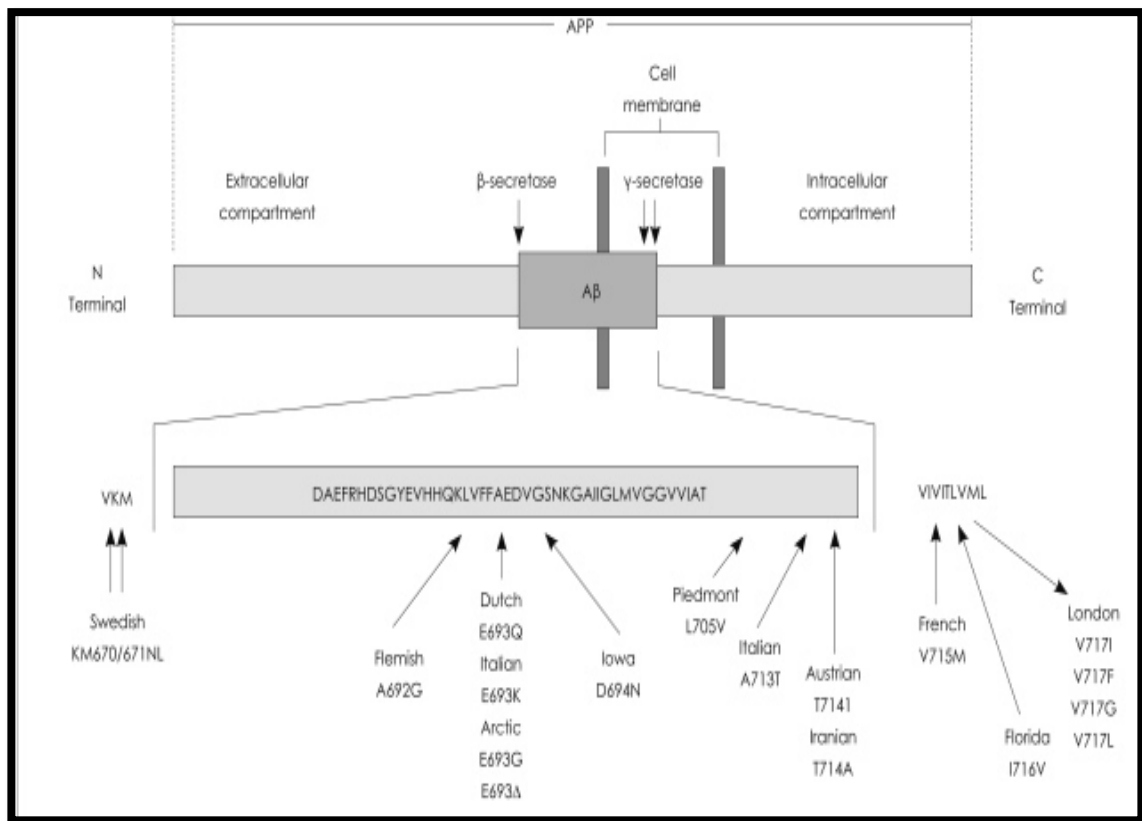


Figura 12: Mutaciones reportadas hasta la fecha en el gen PPA y la relación con la secuencia de aminoácidos del péptido A $\beta$  (67).

#### 1.6.4.3 Procesamiento de PPA (Via amiloidogénica y no amiloidogénica)

PPA es cortada secuencialmente por dos proteínas con actividad de endoproteasa que se encuentran ancladas en la membrana,  $\beta$ - y  $\gamma$ - secretasa, dando como resultado un péptido de A $\beta$  36 a 43 aminoácidos. Este proceso es conocido como la vía amiloidogénica (68). La primera en llevar a cabo la función de endoproteasa en APP es la enzima  $\beta$ -secretasa y libera un derivado largo que es secretado, sAPP $\beta$ . Un fragmento de 99 aminoácidos (CTF $\beta$ ) queda anclado a la membrana, el cual es cortado inmediatamente por la  $\gamma$ -secretasa generando el péptido A $\beta$ . El corte producido por la  $\gamma$ -secretasa es impreciso y

esto ocasiona una heterogeneidad en el extremo C-terminal de los péptidos resultantes. Es por esta razón que existen diferentes especies de A $\beta$ , pero aquellos que terminan en la posición 40 (A $\beta$ 40) son los más abundantes en una proporción del 80 a 90% de todos los péptidos generados, a éste le sigue el de la posición 42 (A $\beta$ 42). Las formas ligeramente más largas de A $\beta$ , en especial A $\beta$ 42, tienden a ser más hidrofóbicas y fibrillogénicas y son estas especies las principales en depositarse en el cerebro (69).

La  $\gamma$ - secretasa es una enzima multimérica compuesta de las subunidades APH1, PEN2, nicastrina y presenilina (PS1 o PS2). Este complejo enzimático contiene una copia de cada subunidad (70), y es responsable del corte de varias proteínas de membrana además de PPA. Aún no se sabe con certeza la función específica de cada subunidad de este complejo enzimático, aunque se han propuesto mecanismos por los cuáles funcionan en conjunto estas subunidades de la  $\gamma$ - secretasa, por ejemplo, de la presenilina se cree que forma el sitio activo de la aspartilproteasa; (71), y la nicastrina podría funcionar como una subunidad de acoplamiento molecular para el sustrato (72). Los cuatro componentes son necesarios para la maduración y correcto funcionamiento de  $\gamma$ -secretasa. Con respecto al mecanismo de acción de la  $\gamma$ -secretasa, de manera general se postula que el corte producido en la bicapa lipídica es producido bajo la señal de sustratos que han sido removidos por otras proteasas que remueven una gran región del ectodominio de PPA (73). Cada subunidad de este complejo tiene una función particular y clave que de manera coordinada llevan a cabo el corte en PPA; no se han identificado requerimientos específicos de secuencias para el reconocimiento de sustrato, y el corte en la membrana es controlado por otros factores tales como el largo del dominio transmembrana (74). Aunque la cantidad de  $\gamma$ -secretasa y su actividad parecen no aumentar en EA, se ha reportado que alteraciones en su actividad que dan como producto formas más largas de A $\beta$  son el principal rasgo genético que causa la forma temprana y familiar de EA (75).

En cuanto a la  $\beta$ -secretasa, es una aspartil proteasa que se encuentra unida a la membrana y de manera análoga a  $\gamma$ -secretasa, corta a PPA dando lugar a  $A\beta$  pero, la localización del sitio de corte en APP difiere en ambas secretasas mientras que la  $\gamma$ -secretasa realiza el corte en la membrana,  $\beta$ - secretasa lo realiza en el ambiente intracelular soluble (76). Existen dos formas abundantes de la enzima, BACE1 y BACE2 (Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme), las cuales poseen un 65% de homología. BACE1 es la enzima responsable en mayor proporción en la producción de  $A\beta$ , se expresa altamente en el cerebro, pero se ha encontrado en niveles menores en otros órganos (77). Por el contrario BACE2, se encuentra en menor abundancia en el cerebro y en otros tejidos periféricos es más abundante. En la forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer, tanto la proteína así como la actividad de la  $\beta$ -secretasa aumentan significativamente, y este efecto también presenta una selectividad en ciertas regiones del cerebro que se ven afectadas y también se correlaciona con la duración de la enfermedad. La actividad de la  $\beta$ - secretasa también se ha visto que aumenta conforme la edad en roedores y en primates no humanos aunque estas especies no desarrollan la Enfermedad de Alzheimer (78).

### **1.7 Hipótesis de la Cascada Amiloide**



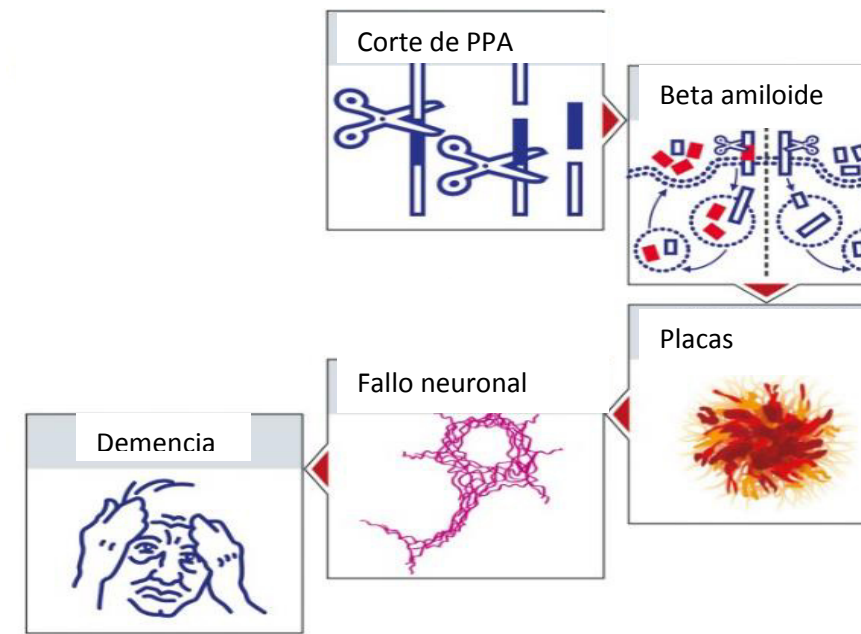


Figura 13: Diagrama de la Hipótesis del Amiloide estipula que el corte proteolítico de PPA genera al péptido beta amiloide y es el factor desencadenante de la demencia en la enfermedad (79).

La hipótesis del amiloide propone que el aumento en la producción del péptido beta amiloide es el factor desencadenante en el cerebro para la disfunción neuronal (80). La sobre producción del péptido beta amiloide, ya sea del fragmento  $A\beta$  (1-42) o  $A\beta$  (1-40), activa una serie de eventos en cascada que culmina en la formación de placas amiloides, marañas neurofibrilares (NFT) y eventualmente el deterioro cognitivo (81). Como se revisó anteriormente, el péptido beta amiloide es producto de la actividad proteolítica de la beta y gamma secretasas sobre PPA. Después del corte, los péptidos son liberados de la membrana y debido a su naturaleza hidrofóbica forman agregados de varios tamaños, los cuáles van desde dímeros a oligómeros que causan fosforilación en Tau, inflamación y neurotoxicidad (82).

### 1.8 Péptido $\beta$ -Amiloide

El péptido  $A\beta$  de 36 a 43 aminoácidos con un peso molecular de 4Kd es el principal componente de los depósitos amiloides en el cerebro de pacientes con Alzheimer. El péptido  $A\beta$  es el producto de la digestión proteolítica de la

proteína precursora del amiloide (PPA) por acción de la beta y gamma secretasas (83).

La proteína Beta-amiloide es intrínsecamente no estructurada, lo que significa que en una solución no adquiere una conformación terciaria compacta, sino como un conjunto de estructuras. Por lo tanto, no puede ser cristalizada, y casi todo el conocimiento sobre la beta-amiloide proviene de estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y dinámica molecular (84).

Los modelos derivados de la RMN son de un polipéptido de 26 aminoácidos, a partir de beta-amiloide A $\beta$  (10-35) que muestran una estructura en espiral, sin una estructura secundaria significativa. Estudios de réplica, cambio y dinámica molecular demuestran que la beta-amiloide se puede encontrar en diversos estados. En simulaciones guiadas por RMN, parece que A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) cuentan con estados de conformación muy diferentes, con el fragmento C-terminal de A $\beta$  (1-42) siendo más estructurado que el de los fragmentos de A $\beta$  (1-40) (85).

La información estructural sobre el estado oligomérico de beta-amiloide es aún escasa. En condiciones de baja temperatura y baja salinidad se lograron aislar los oligómeros pentaméricos en forma de disco de esta proteína, y se vio que son carentes de estructura beta. Por otro lado, oligómeros solubles preparados en presencia de detergentes parecen tener un contenido importante de láminas beta con caracteres paralelos y antiparalelos, los cuáles son diferentes a las fibrillas que se encuentran depositados en el cerebro (86).

En un informe del 2009 se demostró que la producción del  $\beta$ -amiloide tiene un ciclo circadiano, aumenta cuando la persona se encuentra en estado de vigilia y disminuye durante el sueño. Se demostró que la producción del neuropéptido orexina, durante el estado de vigilia, es necesaria para la producción en ritmo circadiano de la  $\beta$ -amiloide. El informe sugiere que largos períodos de vigilia pueden ocasionar una acumulación crónica de  $\beta$ -amiloide, lo cual podría hipotéticamente conducir a la enfermedad de Alzheimer. Lo anterior concuerda

con los recientes hallazgos en los cuales la privación crónica o excesiva de sueño está asociada con el inicio de Alzheimer. La melatonina también se encuentra relacionada con el mantenimiento del ritmo circadiano. En particular, la melatonina ha sido relacionada con el fenómeno "crepuscular", en el cual, los pacientes con enfermedad de Alzheimer que tienen las placas amiloides en el hipotálamo, muestran exacerbación de los síntomas de la enfermedad al final del día. Este fenómeno "crepuscular" puede estar directa o indirectamente relacionado con el descubrimiento reciente sobre el aumento continuo en la producción del  $\beta$ -amiloide durante el transcurso del día (87).

### **1.8.1 Papel fisiológico del péptido A $\beta$**

Estas funciones no asociadas con Alzheimer incluyen la activación de cinasas, la protección contra estrés oxidativo, regulación del transporte de colesterol, actuando como un factor de transcripción y actividad antimicrobiana (especialmente asociado con su acción pro-inflamatoria) (88).

A pesar del papel aparentemente negativo que presenta el A $\beta$  en la enfermedad de Alzheimer, este péptido participa, de una forma que no ha sido explicada con exactitud, en varias funciones celulares normales, por ejemplo:

1. Ejerce una función autócrina y estimula la proliferación celular (89).
2. Promueve la adhesión celular y protege a las neuronas contra daño oxidativo. El péptido sA $\beta$  puede interferir en procesos de señalización, vía proteínas G e incrementar la actividad de la MAP cinasa (90).
3. En concentraciones fisiológicas puede actuar como factor neurotrófico y neuroprotector (91).
4. Se ha planteado que es un regulador fisiológico de la función de canales iónicos ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) en neuronas y que es secretado por algunas de estas células en respuesta a la actividad neuronal para regular negativamente la transmisión sináptica excitatoria (92).

5. Se ha propuesto que los depósitos de A $\beta$  puedan atrapar iones metálicos potencialmente peligrosos (93).

7. Concentraciones nanomolares del péptido pueden bloquear la apoptosis neuronal provocada por la ausencia de factores tróficos (94).

El A $\beta$  posee una alta afinidad por Cu $^{2+}$  y Zn $^{2+}$  y también puede catalizar la dismutación del radical superóxido (O $_2$ ) a H $_2$ O $_2$ , actuando entonces como antioxidante. Se han detectado depósitos de A $\beta$  en cerebros humanos después de daño traumático, y se sabe que tanto el péptido A $\beta$  (1–40), pero especialmente el A $\beta$  (1–42), aumentan su concentración en el fluido cerebroespinal durante la primera semana que sigue a un traumatismo encefálico (95).

Algunos grupos de estudio han mostrado que el número de placas de A $\beta$  y de marañas neurofibrilares en la corteza cerebral están correlacionadas inversamente con el estrés oxidativo, por lo que cuando la concentración del A $\beta$  se incrementa, el daño citoplásmico disminuye. En pacientes con síndrome de Down también existe correlación negativa entre los depósitos de A $\beta$  y daño oxidativo (96).

Sin embargo, a pesar de que se han aislado oligómeros solubles del A $\beta$  tanto de cerebros normales como de cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer, los niveles del péptido soluble suelen ser mayores en pacientes con esta enfermedad que en sujetos normales, siendo mayor la proporción del péptido A $\beta$  (1–42) que la del A $\beta$  (1–40). A $\beta$  (1–42) es menos soluble que las otras isoformas del péptido, desarrolla fibrillas mucho más rápido y promueve la agregación de formas más pequeñas de A $\beta$  (97).

Por otra parte, mediante la utilización de ensayos *in vitro* se sabe que los péptidos que contienen al fragmento hidrofóbico (GAIIGLM) forman lentamente agregados estables y se transforman en neurotóxicos después de un proceso de incubación. En cambio, el fragmento A $\beta$  (25–35) (GSNKGAIIGLM), descrito como la parte más tóxica del péptido, se agrega rápidamente y es neurotóxico

de forma inmediata. Todos estos estudios han demostrado que es necesaria la transición del péptido de una forma soluble monomérica a una insoluble o fibrilar para que sean tóxicos a la célula y que esto es el resultado de un cambio al azar en su estructura secundaria (random coil) y  $\alpha$ -hélice a una de lámina. Asimismo, en 1999 Walsh y colaboradores reportaron que los monómeros y dímeros del A $\beta$  no son tóxicos para las células, mientras que oligómeros agregados de bajo peso molecular llamados protofibrillas sí lo son (98).

### **1.8.2 Proceso de agregación del péptido A $\beta$**

La agregación de proteínas en fibrillas amiloides es el rasgo patológico de muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo a la Enfermedad de Alzheimer la cual se caracteriza, en parte, por la agregación de la proteína beta amiloide (A $\beta$ ) en placas fibrilares de amiloide en ciertas áreas del cerebro (99). Gran cantidad de evidencia sugiere que la agregación del péptido A $\beta$  es un paso crítico en el proceso de neurodegeneración, por lo que prevenirlo puede servir como enfoque terapéutico en el tratamiento de EA (100).

La agregación de A $\beta$  puede definirse como un proceso complicado y que al parecer está involucrada mas de una simple conversión de monómeros solubles en fibras. A $\beta$  existe principalmente como una estructura  $\alpha$ - hélice o random coil, pero puede plegarse de manera incorrecta en estructuras  $\beta$ - plegadas, las cuáles son más propensas a agregarse en forma de oligómeros tóxicos y en fibrillas amiloides insolubles.

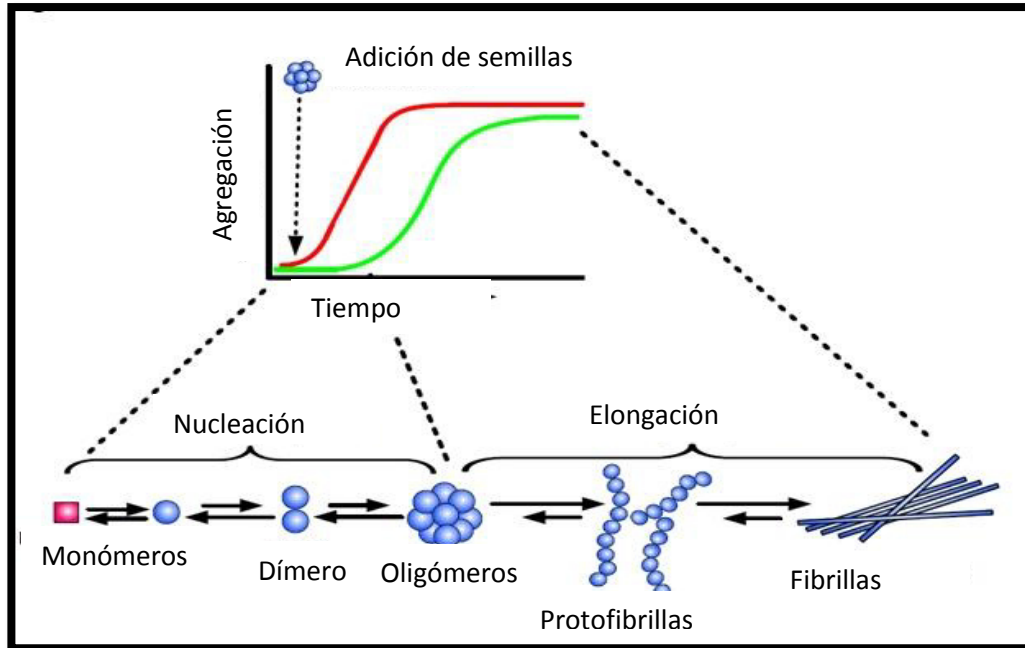


Figura 14: Proceso esquematizado de la cinética de agregación de A $\beta$ , la cual consta de dos etapas, una denominada nucleación donde los primeros monómeros con estructura alfa hélice cambian a beta plegada reclutando e induciendo nuevos monómeros los cuales en la etapa de elongación aumentan su longitud culminando en la formación de las fibrillas (101).

El mecanismo del plegamiento incorrecto del péptido A $\beta$  hacia estructuras  $\beta$ -plegadas ocurre por el plegamiento de los aminoácidos de las posiciones 16-23 y 28-35 para formar esta estructura de lámina beta plegada. Una vez formada, esta estructura tiende a agregarse, y esto por mecanismos que los investigadores denominan nucleación favorece a que las demás formas del péptido beta amiloide sufran esta modificación y empiecen a formar dímeros, oligómeros y finalmente las fibrillas maduras (102).

Los estudios actuales proponen que el rol de los oligómeros solubles del amiloide o los intermediarios pre-fibrilares de agregación, son las principales especies tóxicas en enfermedades neurodegenerativas amiloides. Por ensayos de microscopía electrónica y de fuerza atómica se han identificado partículas esféricas de aproximadamente 3 a 10 nm que aparecen a tiempos tempranos de incubación y desaparecen cuando se forman las fibrillas maduras (103). Estos oligómeros esféricos parecen representar intermediarios en la vía de

formación de las fibrillas, ya que son observados transitoriamente en tiempos intermedios de incubación durante la formación de las fibrillas.

A pesar de que los oligómeros son intermediarios en la cinética de agregación, aún no es claro si estos son intermediarios obligados en la vía de formación de las fibrillas ya sea por que coalescen directamente entre ellos para la formación de las fibrillas, o si bien estos oligómeros generan una vía de agregación diferente a la clásica de ensamble de las fibrillas dependientes de nucleación (104).

### **1.8.3 Oligómeros del péptido A $\beta$**

La hipótesis del oligómero en la Enfermedad de Alzheimer se introdujo en 1998; se basa en la presencia de oligómeros de amiloide libres, los cuales son los responsables de la rápida inhibición del LTP y que estos causan un daño selectivo y rápido en las neuronas (105). Lambert y colaboradores establecieron la presencia y acumulación de oligómeros solubles de A $\beta$ , lo más importante de estos experimentos es que estos oligómeros de A $\beta$  son potentes neurotoxinas.

En un experimento que demostró por primera vez a nivel molecular la pérdida de memoria en EA, estos oligómeros inhibieron funcionalmente la plasticidad neuronal. La potenciación de largo término (LTP) fue inhibida en cuestión de minutos, con exposición crónica a los oligómeros se observó muerte neuronal la cual es específica de ciertas subpoblaciones neuronales (106).

Los oligómeros solubles poseen una gran variedad de nombres, incluyendo agregados amorfos, protofibrillas, miscelas, agregados prefibrilares y ADDLs (ligandos difusibles derivados del péptido beta amiloide) (107).

### **1.8.4 Péptido A $\beta$ 25-35**

A pesar de que los péptidos A $\beta$  (1–40) y A $\beta$  (1–42) son las formas más abundantes de A $\beta$  que son producidas en el cuerpo, se han encontrado fragmentos más cortos que también han sido observados en tejido cerebral. Uno de esos fragmentos cortos corresponde al péptido de 11 aminoácidos

GSNKGAIIGLM correspondiente al segmento 25-35 del péptido más largo del beta amiloide. Este fragmento corresponde al segmento transmembrana de PPA (108).

A $\beta$  (25–35) representa el fragmento más pequeño que naturalmente es formado en el cerebro y el cual retiene tanto la toxicidad y las propiedades de agregación de la molécula de longitud completa. Estas propiedades lo hacen el modelo ideal para el estudio de agregación de los péptidos A $\beta$  de tamaño completo (109).

El péptido A $\beta$  (25–35) es producido en el cerebro de pacientes de edad avanzada por el corte proteolítico de los péptidos solubles de A $\beta$  (1–40). Sao y colaboradores han propuesto que A $\beta$  (25–35) representa la región biológicamente activa de las formas de A $\beta$ , esto debido a que es el fragmento mas corto que posee estructuras de lámina beta plegadas que favorecen la agregación así como la toxicidad del péptido A $\beta$  largo (110).

La forma monomérica del péptido A $\beta$  (25–35) puede ser citotóxica, esto debido a que existen estudios que indican que tanto A $\beta$  (25–35), como A $\beta$  (1–42), sufren cambios conformacionales de una forma soluble a una estructura sin orden y finalmente a agregados fibrilares con estructuras de lámina beta plegada, esto dependiendo de las condiciones ambientales (111).

Como es el caso del péptido A $\beta$  de tamaño completo, A $\beta$  (25-35) es un péptido intrínsecamente desordenado (IDP). En otras palabras no posee una estructura bien definida, y esta tiende a generar múltiples conformaciones. Estos péptidos son difíciles de caracterizar en agua, y su naturaleza desordenada, baja solubilidad, y una gran tendencia a agregarse hacen que sea un gran reto obtener la caracterización estructural completa a través de técnicas como RMN. De acuerdo a este tipo de experimentos, se ha demostrado que A $\beta$  (25-35) adopta diferentes conformaciones y fibrillas morfológicamente distintas dependiendo de las condiciones experimentales (112).



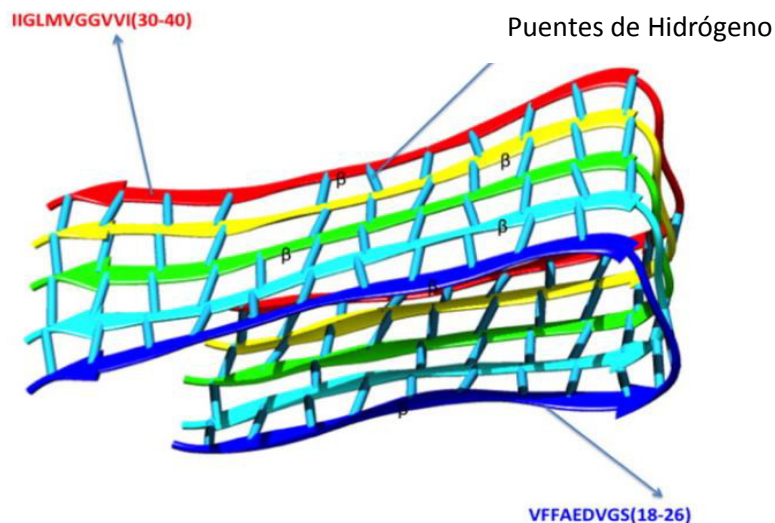


Figura 15: Esquema representativo de la conformación de Aβ(25-35) de estructura beta plegada (113).

### 1.8.5 Péptido Aβ<sub>1-40</sub>

Aβ existe en varias isoformas de las cuales la variante de 40 residuos Aβ (1–40), es la más abundante *in vivo*, mientras que la variante más propensa a agregar es la de 42 residuos Aβ (1–42) (114).

Gran cantidad de evidencias sugieren que existe relación no solo con la Enfermedad de Alzheimer y el Aβ (1-40), sino que también es relacionado con enfermedades donde la edad es un factor clave, tales como la inflamación crónica, esterilidad, aterosclerosis, entre otras (115).

Los péptidos Aβ (1-40) son generados por el corte proteolítico de PPA por acción de la beta y gamma secretasas (116) y este activa una cascada de eventos pro inflamatorios en las células endoteliales y macrófagos produciendo secreción de citocinas y estrés oxidativo culminando en muerte neuronal (117-119).

### **1.8.6 Péptido A $\beta$ 1-42**

El componente mayoritario de las placas seniles de la EA es el fragmento de 42 residuos del péptido A $\beta$ , el cual es generado por el corte proteolítico de PPA por acción de las  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas (120).

El fragmento A $\beta$  (1–42) en comparación con A $\beta$  (1–40), muestra un aumento dramático en la formación de fibrillas *in vitro* (105). Una de las principales características estructurales de las fibrillas formadas por el fragmento A $\beta$  (1–42) es que estas forman uniones cruzadas de estructura beta, las cuales contienen láminas paralelas beta plegadas (121).

Gran cantidad de evidencia sugiere que el deterioro cognitivo es causado por la acumulación de oligómeros de A $\beta$  (1-42) en el cerebro de los pacientes con EA (122). Los oligómeros interrumpen el balance al unirse a proteínas de membrana del plasma, cambio en los niveles intracelulares de calcio (123), inducen la ubicación equivocada de Tau alterando los microtúbulos (124), alteran el tráfico de membranas y alteran los niveles de expresión de ciertos canales iónicos de las uniones sinápticas (125) y por último, causan pérdida reversible de la espina de las neuronas (126). Estas alteraciones dan como resultado daño reversible en la memoria espacial el cual culmina en amnesia anterógrada en las primeras etapas de EA (127).

### **1.8.7 Técnicas de estudio de A $\beta$**

Al observar en el microscopio fragmentos de tejido de cerebros de pacientes con Alzheimer procesados con la técnica de tinción con plata, resalta el grado de heterogeneidad de la patología. Se han creado agentes empleados en técnicas de imagen basado en análogos de tintes histológicos que tienen un poder mayor de discriminación entre los estados conformacionales que pueden ser usados antemortem para evaluar la etapa de la enfermedad y sus componentes patológicos (127). Los patólogos hoy en día emplean tinciones que son específicas de lesiones de la EA, mientras que los bioquímicos buscan la manera de diferenciar los agregados y determinar su composición. Las

estructuras teñidas de plata en cerebros de pacientes con Alzheimer también se tiñen con colorantes clásicos de tinción tales como el Rojo Congo, y Tioflavinas S y T, son agregados fibrilares altamente insolubles y están compuestos en su mayoría de una proteína principal ( $A\beta$  o Tau hiperfosforilada), pero además existen proteínas adicionales y ciertos glicolípidos asociados a los agregados pero no forman parte de las estructuras fibrilares por ellos mismos. Debido a que estos componentes también se encuentran en cerebros sanos, estas proteínas y glicolípidos asociados no se consideran patológicos (sin embargo, ocasionalmente pueden interferir con la detección de  $A\beta$ , particularmente aquellos métodos que emplean un anticuerpo para su detección). Las placas neuríticas ( $A\beta$ ), el amiloide cerebrovascular ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares (Tau hiperfosforilada) pueden ser purificados y separados unos de otros componentes insolubles (128). Resisten a la solubilización, inclusive de detergentes potentes tales como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y Sarcosil, y para la despolimerización son requeridas altas concentraciones de ácido fórmico, finalmente, cuando son removidas las fibras espontáneamente se re ensamblan en su forma previa.

Se realizaron muchos experimentos para poder identificar los componentes principales de las placas y ovillos de cerebros con EA, se llevaron a cabo una serie de extracciones en gradientes para investigar la transición del péptido  $A\beta$  de un monómero soluble a placas difusas y finalmente su depósito en las placas neuríticas. Los estudios de extracción de  $A\beta$  en diferentes etapas de la progresión de EA comparándolos con la histología progresan de la siguiente manera: una extracción con un álcali diluido libera la forma soluble de  $A\beta$ , una extracción con SDS remueve los depósitos difusos y una última extracción con ácido fórmico se requiere para la solubilización de las placas neuríticas y el amiloide cerebrovascular (128). Tejido de cerebro derivado de ratones knock-in APP/PS1 en la etapa correspondiente de la deposición de  $A\beta$  produce perfiles de extracción análogos a los mencionados previamente (129).

Tinciones inmuno-histoquímicas de secciones de tejidos revelaron numerosos depósitos del péptido A $\beta$  (116). El uso de tintes específicos de amiloide tales como el Rojo Congo y las Tioflavinas T y S, iluminan las placas neuríticas, reaccionan muy poco con otros depósitos que se pueden detectar por la tinción de plata esto en cortes de cerebro. La técnica del Rojo Congo se basa en la emisión de birrefringencia al entrar en contacto con el amiloide, esta birrefringencia revela una organización periódica orientada en las placas neuríticas difusas y esta característica es específica de la secuencia del péptido A $\beta$ . La falta de birrefringencia es debido a la falta de estructuras fibrilares. Estudios que emplean anticuerpos dependientes de la conformación de A $\beta$  no son capaces de reconocer depósitos difusos de amiloide pero sí reconocen fibrillas sintéticas y placas neuríticas (130).

Se han llevado a cabo estudios detallados de placas neuríticas teñidas con una serie de derivados fluorescentes de politiofenol (los cuáles tienen un espectro de emisión sensible a la cantidad de fibrillas amiloides) dichos estudios revelaron que las placas individuales o regiones en una sola placa pueden organizarse de manera distinta. Fibrillas sintéticas del péptido A $\beta$  en diferentes condiciones (agitación o quiescentes) se tiñen de manera distinta, lo cual indica la presencia de polimorfismo en las fibrillas de A $\beta$  lo cual es evaluado mediante técnicas de RMN en estado sólido (131).

Hoy en día el enfoque empleado para el estudio de EA *in vivo* consiste en medir la progresión de la enfermedad mediante técnicas no invasivas, y a la par obtener algún método de diagnóstico para detectar la enfermedad en etapas tempranas. Un gran esfuerzo se ha realizado en la búsqueda de biomarcadores en sangre o en LCR tanto para el diagnóstico temprano de la enfermedad y poder predecir la progresión e inclusive poder predecir que individuo es susceptible de padecerla. Esta búsqueda de biomarcadores ha resultado difícil de llevar a cabo y permanece como un área intensiva de investigación (132).

Un enfoque alternativo para el estudio de la EA es utilizando análogos de tintes para la detección de amiloides para visualizar y cuantificar la patología en el

cerebro de los individuos y esto ha producido resultados muy interesantes y además nos ha provisto de un acercamiento a las diferencias entre la enfermedad en humanos y aquellos sistemas empleados para emular la enfermedad en modelos animales. Mientras que la forma oligomérica de A $\beta$  está a concentraciones muy por debajo de los límites de detección de las tecnologías de imagen actuales, otras formas de A $\beta$  (piscinas A $\beta$ ) pueden ser más adecuadas para las técnicas de imagen. El A $\beta$  insoluble en SDS aislado de cerebros de pacientes con EA ha demostrado tener una estructura distintiva que al ser estudiada por RMN  $^{13}\text{C}$  que puede dar lugar al desarrollo de un ligando específico para estudios de imagen (133).

#### **1.8.7.1 ThT y ThS**

La Tioflavina T, compuesto Pittsburgh 1 (PIB, 6-OH-[2, 4-N dimetil-fenil benzotiazol]), es un derivado de tinte amiloide, que fue diseñado con propiedades fisicoquímicas específicas para que sirva como un buen ligando y que se pudiera emplear en técnicas de imagen (134).

Vassar y colaboradores fueron los primeros en emplear el tinte derivado de benzatiol Tioflavina T (ThT) como un potente marcador fluorescente para la detección histológica de amiloides. Ellos observaron que ThT se ubicaba selectivamente en los depósitos de amiloide y esto aumentaba drásticamente su fluorescencia (135). Este cambio en la fluorescencia debido a la unión de la ThT a las fibrillas de amiloide corresponde a un cambio en el máximo de excitación de ThT (de 385 nm a 450 nm) así como en su máximo de emisión (de 445 nm a 482 nm) y este cambio corresponde solamente a la molécula de ThT unida a las fibrillas de amiloide (136). El gran aumento en varios órdenes de magnitud de la intensidad de fluorescencia de ThT al estar unida a las fibrillas de amiloide, lo hacen un reportero sensible y eficiente; su alta solubilidad en agua y moderada afinidad a las fibrillas hacen que sea versátil su uso en sistemas experimentales. Además, diversos estudios han demostrado que ThT se une tanto a fibrillas sintéticas así como de fuentes biológicas (137).

A nivel molecular, los amiloides poseen una arquitectura rica en láminas beta plegada perpendiculares al eje de la fibrilla. Los estudios de Naiki y colaboradores demostraron que ThT se une a estas láminas beta de las fibrillas, por lo que el uso de ThT y derivados no sólo funciona como indicadores en la presencia de las fibrillas maduras sino que también pueden ser utilizados como herramienta para el estudio estructural durante la formación de amiloides (138).

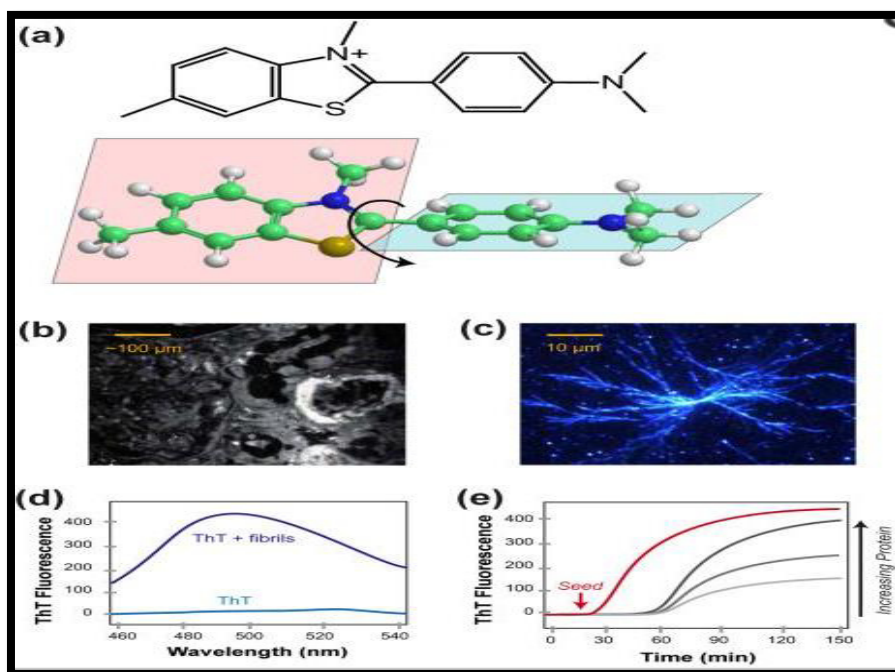


Figura 16: Esquema del empleo de distintas técnicas para el estudio de agregados amiloides usando ThT como sonda fluorescente. (a) estructura química de ThT ,(b) microscopia electrónica de una placa senil, (c) microscopia de fluorescencia de una placa amiloide,(d) espectro de fluorescencia de ThT sólo y unida a fibrillas, (e) cinética de agregación de beta amiloide con ThT(139).

### 1.8.7.2 ANS

El ácido 8-anilino-1-naftalen sulfónico (ANS) es una sonda fluorescente que es extensivamente utilizada en la caracterización de sitios de unión de proteínas; esto debido a la gran afinidad del ANS a las superficies hidrofóbicas de las proteínas (140 - 141). ANS sufre un desplazamiento hacia el azul y aumenta su fluorescencia cuando está unido a las regiones no polares de la superficie de la

proteína por lo que es usado como monitor del plegamiento proteico (142-143). El anión del ANS es fuerte y se une predominantemente a grupos catiónicos de proteínas solubles en agua esto por la formación de pares iónicos, por lo que la unión de ANS y proteína depende del pH y la estequiometría (144).

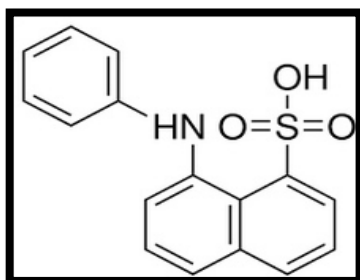


Figura 17: Estructura química del ANS

### 1.9 Estrés oxidativo y la Enfermedad de Alzheimer

El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo ya que presenta una elevada tasa metabólica derivada de la glucosa, posee niveles muy bajos de defensas antioxidantes, contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, que son posible blanco de peroxidación lipídica, y además es rico en actividades enzimáticas relacionadas con metales de transición, los cuales pueden catalizar la formación de radicales libres (145).

Aunque el mecanismo por el cual el A $\beta$  genera radicales libres en la enfermedad de Alzheimer no está totalmente esclarecido, se ha definido que estas especies reactivas causan peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y pérdida de integridad de la membrana. Esto trae como consecuencia la inhibición de ATPasas, pérdida de la homeostasis del calcio, inhibición del sistema de captura de glutamato dependiente de sodio en células gliales, alteración de vías de señalización, activación de factores transcripcionales y finalmente apoptosis (146) .

Las evidencias que indican que la citotoxicidad del A $\beta$  es mediada a través de radicales libres son variadas y entre ellas podemos mencionar:

1) Concentraciones micromolares de A $\beta$  provocan un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células en cultivo, sin embargo, la presencia de catalasa o de SOD previene la toxicidad del péptido (147).

2) Células seleccionadas por su resistencia al A $\beta$  son también altamente resistentes al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y contienen altos niveles de glutatión (148).

3) Por otro lado, se han detectado niveles altos de ERO intracelulares en individuos con síndrome de Down que sobreexpresan al gen de la PPA (149).

Aunque por mucho tiempo se ha pensado que el generador de ERO en la enfermedad de Alzheimer es exclusivamente el A $\beta$ , se ha planteado también la existencia de otras fuentes de radicales libres, tales como el Fe<sup>3+</sup>, que se encuentra incrementado en las marañas neurofibrilares y en los depósitos de A $\beta$ . El Fe<sup>3+</sup> cataliza la formación de HO• a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como la formación de productos de glucosilación avanzada o AGE (Advanced Glycation End Products). Al<sup>3+</sup> por su parte, también se acumula en las marañas neurofibrilares, estimulando la peroxidación lipídica inducida por Fe<sup>3+</sup> (150).

Por otra parte, la microglia activada que rodea las placas seniles es una fuente de NO y O<sub>2</sub>, que a su vez pueden reaccionar para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Los AGE en presencia de metales de transición pueden también producir especies reactivas (151). Además, tanto los AGE como el A $\beta$  pueden reconocer receptores de membrana específicos tales como RAGE (Receptor– Advanced Glycation End products) y RS (Receptor Scavenger), mecanismo que a su vez puede incrementar la producción de ERO (152).

A pesar de las controversias al respecto, es un hecho que el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer presenta un estado de estrés oxidativo severo, detectándose un aumento en la peroxidación de lípidos, bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, Polyunsaturated Fatty Acids) y un incremento en el 4-hidroxinonenal (HNE), un producto aldehídico neurotóxico proveniente de la oxidación de los PUFA. El HNE puede difundir desde el sitio de su producción, modificar organelos neuronales y alterar su función. El daño



oxidativo que se presenta en el Alzheimer incluye AGE, productos de nitrosilación, proteínas de neurofilamentos carbonil-modificadas y carbonilos libres (153).

Asimismo, existe un incremento en la oxidación proteica y un aumento en la oxidación del ADN detectado por niveles altos de su producto de degradación, el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). El aumento de este último compuesto, sin embargo, no siempre se lleva a cabo, pues se han encontrado niveles muy bajos de 8-OHdG en algunos casos de Alzheimer con grandes depósitos de A $\beta$ . Estos hallazgos pueden parecer contradictorios, pero dan evidencia de que el A $\beta$  y las marañas neurofibrilares, pueden constituir una respuesta de la célula al estrés oxidativo al tener funciones anti-oxidantes, al menos en las etapas iniciales de la enfermedad (154).

Con respecto a la respuesta inmune, se sabe que en procesos normales de inflamación se generan ERO que dañan al tejido circundante. A pesar de que la inflamación aguda, que incluye edema e invasión de neutrófilos no es característica de la enfermedad de Alzheimer, existe evidencia de daño celular mediado por células del sistema inmune. Una evidencia que sustenta la posibilidad de un proceso inflamatorio en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, es el hecho de que una terapia basada en drogas anti-inflamatorias no esteroideas trae beneficios cognitivos. Una fuente potencial importante de ERO en el cerebro es la microglia, que de forma similar a los monocitos de la sangre o a los macrófagos peritoneales, son células que una vez activadas presentan una actividad fagocítica alta. La microglia activada *in vitro* produce radicales O<sub>2</sub>, lo cual sugiere que el A $\beta$  es indirectamente neurotóxico por la activación de la microglia y la consecuente generación de radicales libres (155).

La respuesta inflamatoria secundaria a la acción del A $\beta$  fue estudiada primeramente en macrófagos peritoneales (109). En estas células, el A $\beta$  25-35 y el (1-40) son capaces de estimular a la NADPH oxidasa, una fuente importante de radical O<sub>2</sub> (110). El péptido (1-40) causa además un incremento

en la producción de NO. Asimismo, se ha detectado la formación de NO en microglia por un aumento en la actividad de la óxido nítrico sintasa causada por el péptido. El NO resultante puede reaccionar rápidamente con el radical  $O_2^-$  que se produce en la mitocondria y formar  $ONOO^-$ . Además, la exposición de microglia al  $A\beta$  provoca un aumento en la expresión de varias interleucinas como  $TNF-\alpha$  y  $TGF-\beta$  entre otras sustancias moduladoras de las cascadas inmunes. (156)

Por otra parte, se sabe que el metabolismo energético de las neuronas está deteriorado en cerebros afectados con la enfermedad de Alzheimer. La tomografía de emisión de positrones de pacientes con Alzheimer muestra una disminución progresiva en el metabolismo de la glucosa en el cerebro y un menor flujo sanguíneo en los lóbulos parietal y temporal, que correlaciona con el grado de demencia de los pacientes. La primera evidencia de una posible relación entre el estrés oxidativo y alteraciones en el transporte de glucosa fue encontrada por estudios de neuronas en cultivo, en los que se encontró que el  $A\beta$  altera la captura de glucosa, lo que causa a su vez un decremento en los niveles de ATP. Se ha sugerido que esto es provocado por la conjugación HNE con la proteína transportadora de glucosa, GLUT3. Las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en el cerebro limitan la síntesis de acetil-colina, glutamato, aspartato, ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glicina y ATP (157).

### **1.9.1 Metionina y estrés oxidativo**

La Metionina es uno de los aminoácidos que mas fácilmente puede oxidarse dando lugar a sulfóxido de metionina, el cual puede existir en dos formas diastereoméricas. Se postula que la oxidación de la metionina puede servir para dos propósitos: a) como función regulatoria; b) como defensa antioxidante (158).

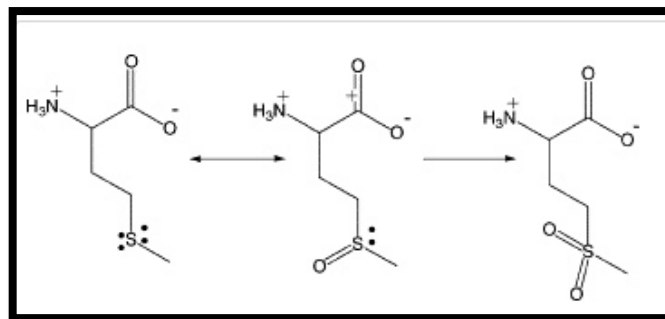


Figura 18: Esquema del mecanismo de generación de radicales libres de la Metionina 35 de A $\beta$  (159).

La formación de radicales libres producto de la oxidación del azufre en la metionina presente en péptidos ha sido estudiada extensivamente. El átomo de azufre puede ser atacado fácilmente por radicales hidroxilo dando lugar a la formación del radical catiónico Sulfuramil ( $S^+$ ) el cuál es inestable. En el caso de los péptidos A $\beta$  al tener un residuo de metionina en la posición 35 se postula que existe una interacción del átomo de azufre con el oxígeno del grupo carbonilo de la Isoleucina 31 dando como resultado un intermediario que puede ser oxidado por oxígeno molecular y generar el radical libre Sulfuramil (160).

Es debido a este complejo proceso de producción de radicales libres, y como resultado, la generación de estrés oxidativo por parte de la Metionina en la posición 35 de A $\beta$  se ha propuesto diversas estrategias para disminuir o inclusive eliminar el estrés celular generado. Estrategias para disminuir la producción de radicales libres por parte de la Metionina 35 podemos mencionar desde tratamientos con moléculas antioxidantes cómo la Vitamina E la cuál modificó los efectos neurotóxicos de A $\beta$ (1-42) (161-162). También se ha propuesto la modificación estructural de la Metionina en la secuencia aminoacídica de A $\beta$ ; desde la sustitución del átomo de Azufre por grupos metileno lo cual generó una mutante A $\beta$ (1–42M35NLE) derivada de norleucina, la cual fue añadida a un cultivo primario de 9-11 días y se observó que no se produjo oxidación de proteínas, no hubo neurotoxicidad y no se formaron radicales libres (163).

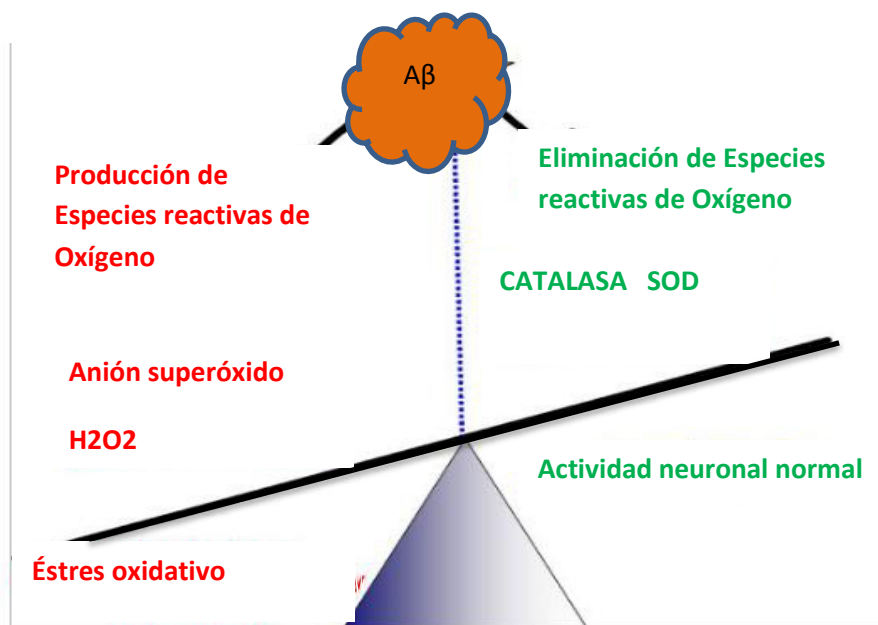


Figura 19: Esquema de generación de ROS por A $\beta$  (161).

### 1.10 Inhibidores de la agregación de A $\beta$

La formación de placas de A $\beta$  es el rasgo patológico que es mas asociado con EA; por lo que disminuir o inclusive eliminar la cantidad del péptido A $\beta$  para evitar su agregación es la estrategia a seguir en la búsqueda para futuros tratamientos farmacológicos. Se ha comprobado el papel que tiene el péptido A $\beta$  de manera normal en el organismo por lo que la mera presencia de él no es causa de la neurodegeneración en EA. A $\beta$  debe llevar a cabo una serie de cambios conformacionales y de plegamiento incorrecto culminando en la formación de agregados, los cuales se depositan en el cerebro y estos son los que principalmente causan neurotoxicidad (164).

Es por lo anterior que un enfoque racional para la búsqueda de terapias farmacológicas sería el uso de inhibidores de la agregación de A $\beta$ ; y es en este sentido donde se han buscado inhibidores de fuentes tan diversas que van desde los productos naturales hasta los basados en peptidomimética. Una

terapia farmacológica ideal para EA es aquella que el inhibidor sea específico de agregados patológicos, sea capaz de reducir la agregación y/o toxicidad de A $\beta$ , que él mismo no sea tóxico y que a su vez sea capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica.

Es debido a lo anterior que se ha propuesto utilizar modificaciones estructurales que interfieran en el mecanismo de agregación de A $\beta$ ; esto debido a que A $\beta$  tiene la capacidad de reconocerse él mismo para favorecer la agregación y además, de que es bien conocido que la secuencia aminoacídica está directamente relacionada con sus propiedades de agregación (165-166)

Existen reportes donde se han producido inhibidores péptidicos de la agregación de A $\beta$  basados en la modificación estructural del mismo, esto mediante mutaciones puntuales en aminoácidos que parecen ser claves en el proceso de agregación de A $\beta$ . De estos trabajos podemos destacar inhibidores sintéticos basados en D-amino estereoisómeros de A $\beta$  para generar péptidos más resistentes a proteasas (proporcionándoles mayor resistencia y mayor durabilidad) (167). Otra modificación a la secuencia de aminoácidos propuesta es la conversión a aminoácidos N-metilados el cual de manera *in vitro* redujo la agregación de A $\beta$  nativo (168).

Así como se han tenido resultados favorables en la búsqueda de inhibidores de la agregación de A $\beta$  bajo el enfoque de modificarlo estructuralmente, se han obtenido inhibidores péptidicos sintéticos como es el caso del D-hexapéptido (klvffa), el cual comprende la región de los aminoácidos 16 al 21 de A $\beta$ , los cuales inhiben la agregación *in vitro*, pero desafortunadamente el mismo inhibidor se agregaba (169).

Para el presente trabajo se decidió modificar la secuencia aminoacídica de A $\beta$  en las posiciones A30W, K28A y M35C en los fragmentos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40), y A $\beta$ (1-42) ya que debido a experimentos previos de docking molecular parecen ser claves en el proceso de agregación.

## CAPITULO II: JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Alzheimer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública que disminuye la esperanza de vida de la persona que lo padece e inclusive puede llevarla hasta la muerte. Los mecanismos que la originan aun no han sido totalmente esclarecidos y se ha propuesto a la hipótesis del amiloide como una de las principales causas de la enfermedad. El proceso patológico desencadenante de la enfermedad de Alzheimer propuesto en la hipótesis del amiloide es el ensamblaje del péptido A $\beta$  y la formación de oligómeros tóxicos por lo que prevenirlo es clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas. Debido a lo anterior el presente trabajo pretende caracterizar *in vitro*, y estudiar el efecto en cultivo celular de variantes en la agregación del péptido.

### HIPÓTESIS

Las mutantes A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (A30W) y A $\beta$ (M35C) difieren en el mecanismo de agregación, citotoxicidad y producción de especies reactivas de oxígeno con respecto A $\beta$  (25-35), A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) silvestre y modifican su cinética de agregación.

## **CAPITULO III: OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Estudiar la agregación y citotoxicidad del péptido A $\beta$  y sus mutantes.

### **3.2. Objetivos específicos**

- 1.- Comparar las cinéticas de agregación en presencia de ThS y ANS de los péptidos silvestres y mutantes.
- 2.- Estudiar las interacciones entre los péptidos silvestres y las variantes en la agregación de los péptidos silvestres.
- 3.- Determinar la citotoxicidad, viabilidad celular y especies reactivas de oxígeno de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

## **CAPÍTULO IV: MATERIALES**

### **4.1 REACTIVOS**

#### **4.1.1. Solubilización del péptido A $\beta$**

- Agua miliQ
- NaOH (Sigma Aldrich)

#### **4.1.2. Cinéticas de agregación**

- PBS 1X
- Tioflavina S
- 1-Anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS)

#### **4.1.3 Cultivo y viabilidad celular**

- Cell Titer 96 Aqueous non radioactive assay (Promega)

Todos los reactivos de la marca Invitrogen-Gibco

- Aminoácidos no esenciales (10Mm 100X)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM)
- L-Glutamina (200Mm 100X)
- Suero Bovino Fetal (FBS)
- Tripsina – EDTA (0.25%)
- Solución de antibiotic-penicilina-estreptomicina (100UI/ml de penicilina G de sodio y 100  $\mu$ l/ml de sulfato de estreptomicina)
- Azul de Tripano (0.4%) (Gibco)

### **4.2 MATERIALES**

#### **4.2.1. Materiales de uso general**

- Micropipetas automáticas (Bio Pet) de volumen variable: 0.5-10 $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L
- Puntillas para micropipetas



- Tubos eppendorf de 0.2,0.6 y 2ml

#### 4.2.2. Cinéticas de agregación

- Tubos Falcon de 50ml
- Microplacas de 96 pozos negras

#### 4.2.3 Cultivo celular

- Pipetas serológicas estériles de 5 y 10ml (Corning)
- Placas Petri de 100 x 15 mm (Corning)
- Placas de 96 pozos, tratadas, estériles, de fondo transparente (Corning)
- Crioviales de 1.5 ml (Corning)
- Cámara de Neubauer (Baxter Scientific Products)
- Pipetas Pasteur ( Corning)

#### 4.2.4 Material biológico

- Línea celular C-6 Glioblastoma de rata Wistar (Rattus norvegicus albinus).
- Péptidos (GenSript)

Tabla 5: Secuencia aminoacídica de los péptidos utilizados.

<b>Péptido A<math>\beta</math></b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>35-25</sub></b>	<b>MLGIIAGKNSG</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>25-35</sub>wt</b>	<b>GSNKGAIIGLM</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>25-35</sub>(K28A)</b>	<b>GSNAGAIIGLM</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>25-35</sub>(A30W)</b>	<b>GSNKGWIIGLM</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>25-35</sub>(M35C)</b>	<b>GSNKGAIIGLC</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-40</sub>wt</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV</b> <b>GSNKGAIIGLMVGGW</b>

<b>A<math>\beta</math><sub>1-40</sub>(K28A)</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNAGAIIGLMVGGW</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-40</sub>(A30W)</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGWIIGLMVGGW</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-40</sub>(M35C)</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGW</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>wt</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGW</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>(A30W)</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGKIIGLMVGGW</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>(K28A)</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNAGAIIGLMVGGW</b>
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>(M35C)</b>	<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGW</b>

## 4.3 EQUIPOS

### 4.3.1. Equipo de uso general

- Vortex Genie

### 4.3.2 Solubilización y cinéticas del péptido

- Sonicador ultrasonic processor
- GloMax <sup>®</sup>- Multi Detection System (Promega)

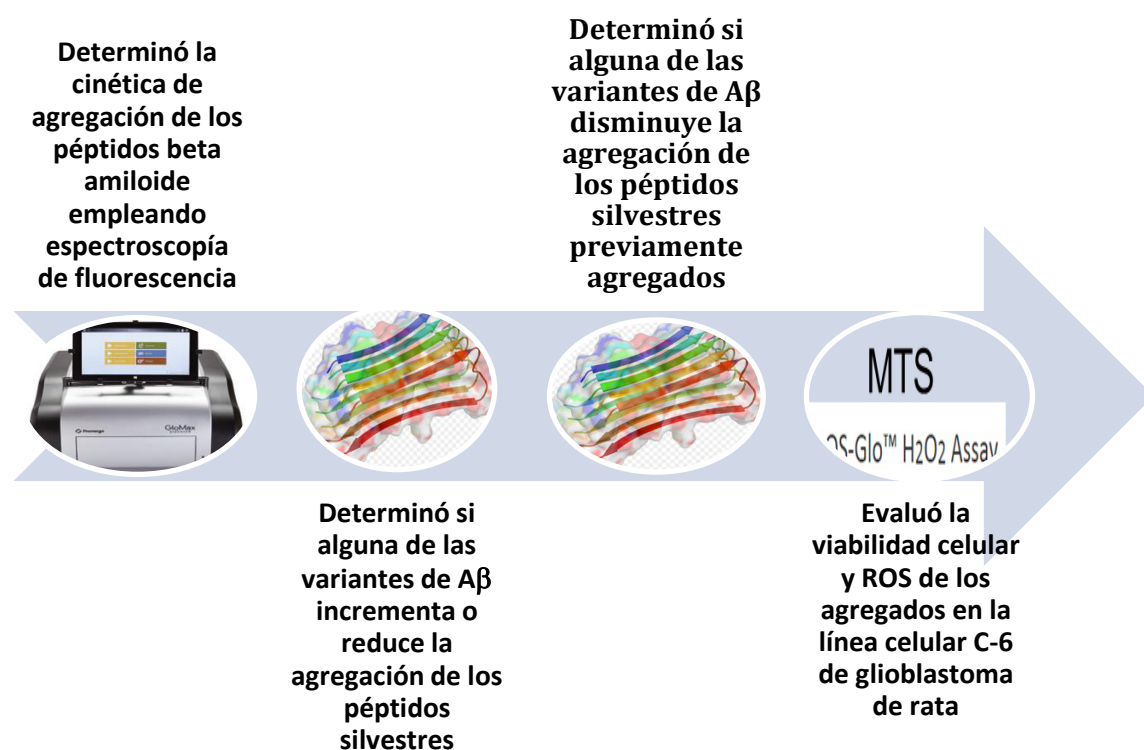
### 4.3.3 Cultivo celular

- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuaire)
- Incubadora con agitación MaxQ4000 (Thermo Scientific)
- Incubadora de CO<sub>2</sub> (Nuaire)
- Microscopio óptico invertido Olympus CKX41
- Baño de agua Precision180

## CAPÍTULO V: MÉTODOS

### ESTRATEGIA GENERAL

Para llevar a cabo los objetivos planteados en el presente proyecto de tesis, se realizó la siguiente estrategia general.



## **5.1 Cinéticas de agregación empleando ThS como sonda de agregados amiloides**

### **5.1.1 Solubilización del péptido**

1. Se pesó 1mg de los péptidos en balanza analítica.
- 2.- En campana de flujo laminar se disolvieron en 200 $\mu$ L de NaOH 2Mm y 800 $\mu$ L de PBS 1X obteniendo un volumen final de 1mL.
- 3.- Se sonicó en baño de agua por 15 minutos en frío y se prepararon alícuotas de 200 $\mu$ L en tubos, las cuales se guardaron a -20°C.
- 4.- Las alícuotas tenían una concentración de 1mM en el caso de A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes y para A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes de 250 $\mu$ M.

### **5.1.2 Cinética de agregación**

- 1.- En tubos de 1mL con rosca se colocaron 15.2 $\mu$ L del stock de 1mM (esto en el caso de A $\beta$ -25-35 silvestre y mutantes) y 357.2 $\mu$ L de PBS 1X. Para A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes se colocaron 60.8 $\mu$ L de la solución stock de 250 $\mu$ M y 311.6 $\mu$ L de PBS 1X. En ambos casos se obtuvo una concentración final de 40 $\mu$ M y se realizaron experimentos por duplicado.
- 2.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocó en agitación de 340rpm a 37°C a los siguientes tiempos: 0,0.5, 1, 5, 7.5, 10, 15, 24, 48, 72 y 96 horas.
- 3.- Terminado el tiempo de incubación se agitó en vortex por 15 segundos y se colocó 7.6 $\mu$ L de una solución stock de Tioflavina S 1X (para conocer la proporción de agregados de tipo amiloide) obteniendo una concentración final de 20 $\mu$ M en el volumen final de 380 $\mu$ L.
- 4.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron 120 $\mu$ L por pozo en una placa de 96 pozos de fondo oscuro.
- 5.- Posteriormente, se leyó la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación 430nm y de emisión 550nm.

### Diagrama de flujo de la cinéticas de agregación en presencia de ThS

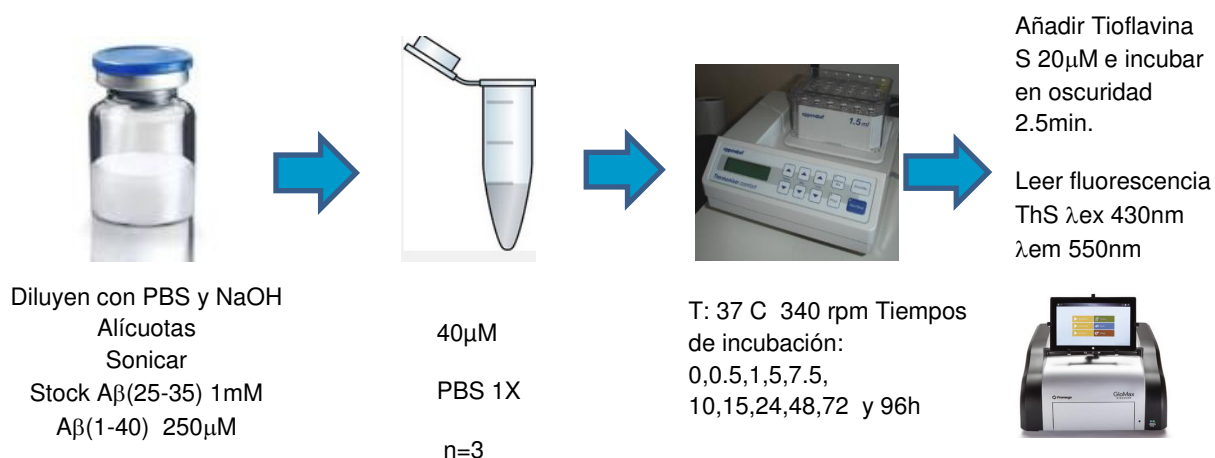


Figura 20: Diagrama de flujo para la cinética de agregación de A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes.

Tabla 6: Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y sus respectivas mutantes empleados para las cinéticas de agregación empleando ThS.

A $\beta$ (25-35)WT	A $\beta$ (1-40)WT	A $\beta$ (1-42)WT
A $\beta$ (25-35)M35C	A $\beta$ (1-40)M35C	A $\beta$ (1-42)M35C
A $\beta$ (25-35)A30W	A $\beta$ (1-40)A30W	A $\beta$ (1-42)A30W
A $\beta$ (25-35)K28A	A $\beta$ (1-40)K28A	A $\beta$ (1-42)K28A
A $\beta$ (35-25)		

## **5.2 Cinéticas de agregación empleando ANS como sonda de agregados amorfos**

### **5.2.1 Solubilización del péptido**

1. Se llevó a cabo el procedimiento de solubilización del péptido descrito anteriormente.

### **5.2.2 Cinética de agregación**

1.- En tubos de 1mL con tapa se colocaron 15.2 $\mu$ L del stock de 1mM (esto en el caso de A $\beta$ -25-35 silvestre y mutantes) y 345.8 $\mu$ L de PBS 1X. Para A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes se colocaron 60.8 $\mu$ L de la solución stock de 250 $\mu$ M y 300.2 $\mu$ L de PBS 1X. En ambos casos se obtuvo una concentración final de 40 $\mu$ M y realizaron experimentos por duplicado.

2.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron en agitación de 340rpm a 37°C grados a los siguientes tiempos: 0,0.5, 1, 5, 7.5, 10, 15, 24, 48, 72 y 96 horas.

3.- Terminado el tiempo de incubación se agitó en vortex por 15 segundos y se colocó 19 $\mu$ L de una solución stock de ANS 1X (conocer la proporción de agregados amorfos) obteniendo una concentración final de 50 $\mu$ M en el volumen final de 380 $\mu$ L.

4.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron 120 $\mu$ L por pozo en una placa de 96 pozos de fondo oscuro.

5.- Para finalizar se leyó la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación a 365nm y de emisión a 410-460nm.

### Diagrama de flujo de la cinéticas de agregación en presencia de ANS

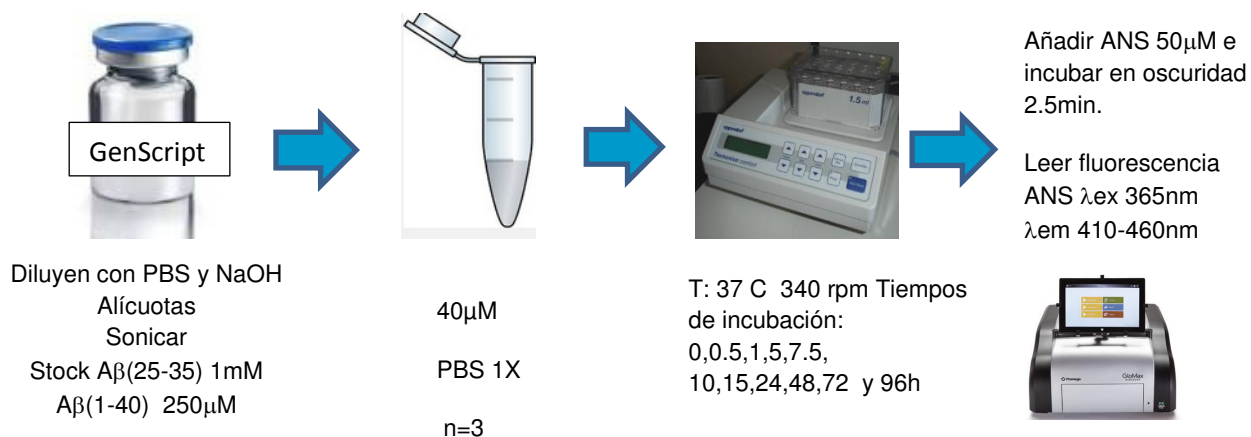


Figura 21: Diagrama de flujo para la cinética de agregación de Aβ(25-35), Aβ(1-40) silvestre y mutantes.

Tabla 7: Lista de de los péptidos Aβ(25-35), Aβ(1-40) silvestre y sus respectivas mutantes empleados para las cinéticas de agregación empleando ANS.

Aβ(25-35)WT	Aβ(1-40)WT	Aβ(1-42)WT
Aβ(25-35)M35C	Aβ(1-40)M35C	Aβ(1-42)M35C
Aβ(25-35)A30W	Aβ(1-40)A30W	Aβ(1-42)A30W
Aβ(25-35)K28A	Aβ(1-40)K28A	Aβ(1-42)K28A
Aβ(35-25)		

### **5.3 Co-incubación de mutantes previamente agregadas/péptido silvestre proporción 25:5**

#### **5.3.1 Solubilización del péptido**

1. Se llevó a cabo el procedimiento de solubilización del péptido descrito anteriormente

#### **5.3.2 Pre-incubación de mutante**

1.- La mutante fue pre-incubada 96 horas a una concentración de 40 $\mu$ M, posteriormente se colocó el péptido silvestre a una proporción de 25 (40 $\mu$ M) y la mutante a una proporción de 5 (8 $\mu$ M) (25:5).

#### **5.3.3 Cinética de agregación**

1.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocó en agitación de 340rpm a 37°C a los siguientes tiempos: 0,0.5, 1, 5, 7.5, 10, 15, 24, 48, 72 y 96 horas.

2.- Terminado el tiempo de incubación, se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron 7.6 $\mu$ L de una solución stock de Tioflavina S 1X obteniendo una concentración final de 20M en el volumen final de 380 $\mu$ L.

3.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron 120 $\mu$ L por pozo en una placa de 96 pozos de fondo oscuro.

4.- Para finalizar se leyó la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación a 365nm y de emisión a 410-460nm.



**Diagrama de flujo de la co-incubación de mutantes previamente agregadas/ péptido silvestre proporción 25:5**

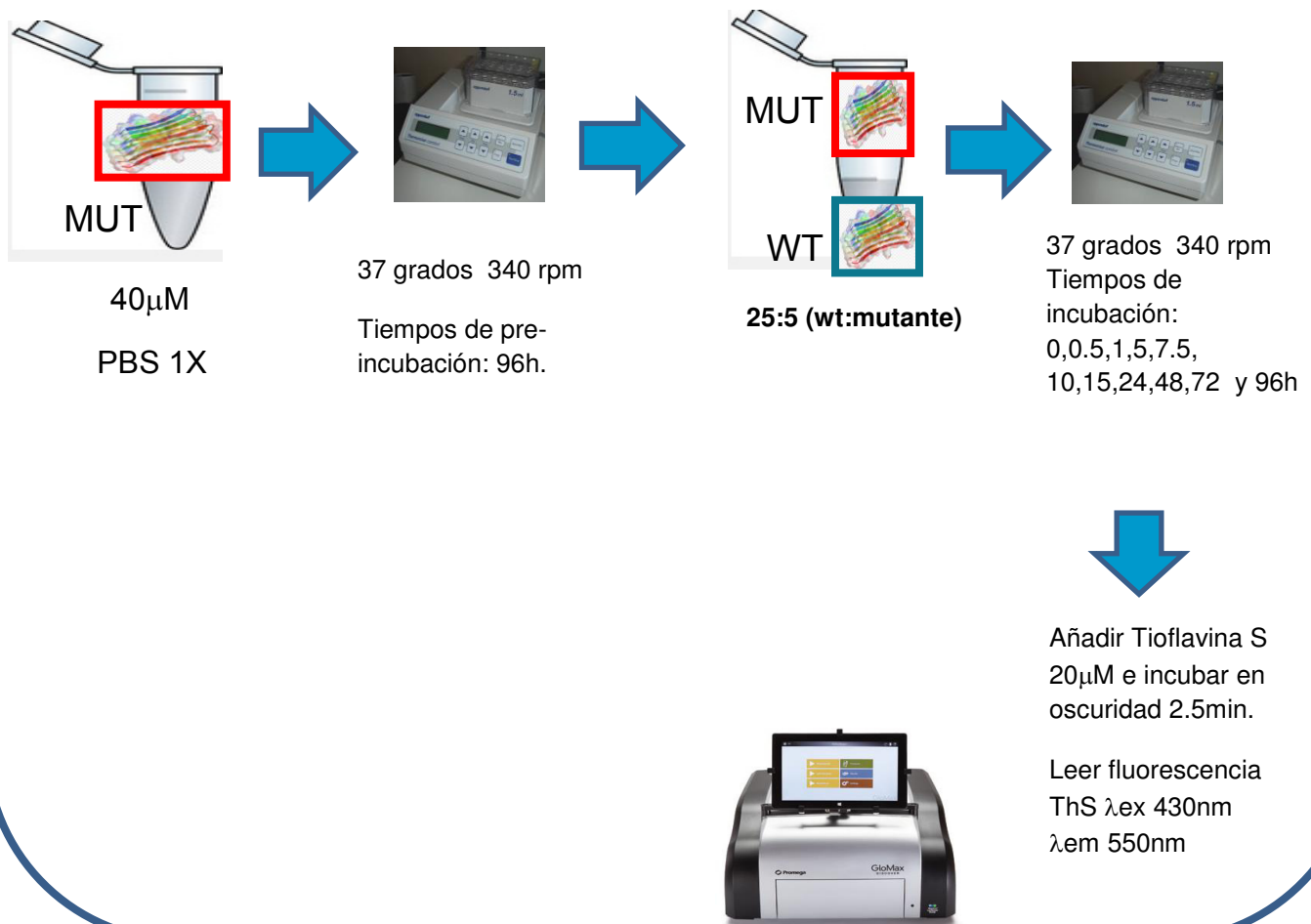


Figura 22: Diagrama de flujo para la cinética de agregación de las co-incubaciones de las mutantes agregadas con los péptidos silvestres.

Tabla 8: Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestre y sus respectivas mutantes (agregadas) empleadas en cada experimento de co-incubación.

<b>A<math>\beta</math>(25-35)wt/A<math>\beta</math>(25-35)A30W</b>	<b>A<math>\beta</math>(25-35)wt/A<math>\beta</math>(25-35)K28A</b>	<b>A<math>\beta</math>(25-35)wt/A<math>\beta</math>(25-35)M35C</b>
<b>A<math>\beta</math>(1-40)wt/A<math>\beta</math>(1-40)A30W</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-40)wt/A<math>\beta</math>(1-40)K28A</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-40)wt/A<math>\beta</math>(1-40)M35C</b>
<b>A<math>\beta</math>(1-42)wt/A<math>\beta</math>(1-42)A30W</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-42)wt/A<math>\beta</math>(1-42)K28A</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-42)wt/A<math>\beta</math>(1-42)M35C</b>

## **5.4 Co-incubación de mutantes/péptido silvestre previamente agregado proporción 25:5**

### **5.4.1 Solubilización del péptido**

1. 1. Se llevó a cabo el procedimiento de solubilización del péptido descrito anteriormente

### **5.4.2 Pre-incubación de mutante**

1.- El péptido silvestre fue pre-incubado 96 horas a una concentración de 40 $\mu$ M posteriormente, se colocó la mutante a una proporción de 25 (40 $\mu$ M) y péptido silvestre a una proporción de 5 (8 $\mu$ M) (25:5)

### **5.4.3 Cinética de agregación**

1.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocó en agitación de 340rpm a 37°C a los siguientes tiempos: 0,0.5, 1, 5, 7.5, 10, 15, 24, 48, 72 y 96 horas.

2.- Terminado el tiempo de incubación, se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron 7.6 $\mu$ L de una solución stock de Tioflavina S 1X obteniendo una concentración final de 20M en el volumen final de 380 $\mu$ L.

3.- Se agitó en vortex por 15 segundos y se colocaron 120 $\mu$ L por pozo en una placa de 96 pozos de fondo oscuro.

4.- Para finalizar se leyó la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación a 365nm y de emisión a 410-460nm.

## Diagrama de flujo de la co-incubación de mutantes/péptido silvestre agregado proporción 25:5

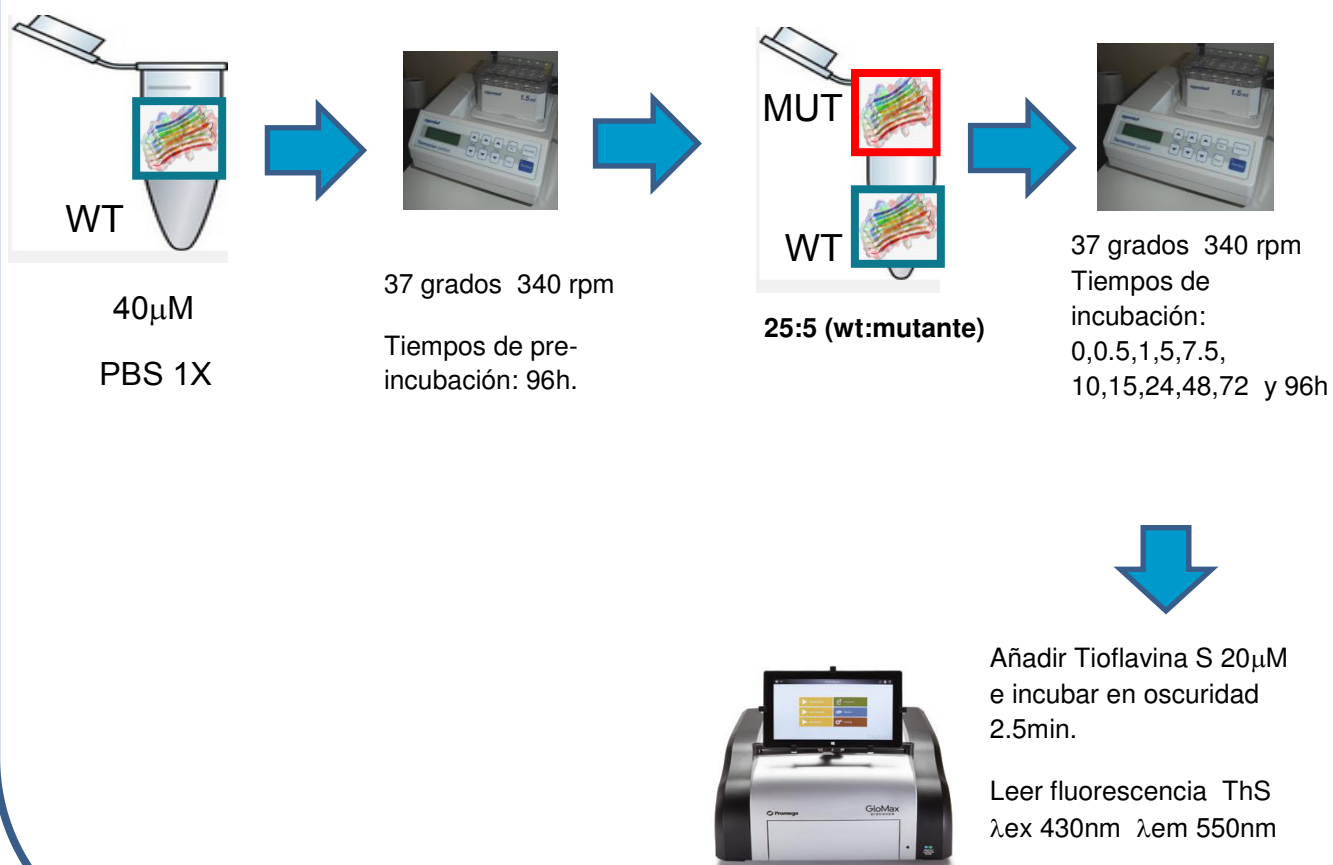


Figura 23: Diagrama de flujo para la cinética de agregación de las co-incubaciones de las mutantes con los péptidos silvestres agregados.

Tabla 9: Lista de de los péptidos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) silvestres agregados y sus respectivas mutantes empleadas en cada experimento de co-incubación.

<b>A<math>\beta</math>(25-35)wt/A<math>\beta</math>(25-35)A30W</b>	<b>A<math>\beta</math>(25-35)wt/A<math>\beta</math>(25-35)K28A</b>	<b>A<math>\beta</math>(25-35)wt/A<math>\beta</math>(25-35)M35C</b>
<b>A<math>\beta</math>(1-40)wt/A<math>\beta</math>(1-40)A30W</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-40)wt/A<math>\beta</math>(1-40)K28A</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-40)wt/A<math>\beta</math>(1-40)M35C</b>
<b>A<math>\beta</math>(1-42)wt/A<math>\beta</math>(1-42)A30W</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-42)wt/A<math>\beta</math>(1-42)K28A</b>	<b>A<math>\beta</math>(1-42)wt/A<math>\beta</math>(1-42)M35C</b>

## **5.5 Ensayos de viabilidad celular en la línea celular C6 de glioblastoma de rata**

- 1.- Los péptidos fueron pre-incubados 96 horas a una concentración de 40 $\mu$ M. Se realizaron 2 experimentos independientes.
- 2.-Se sembraron 20,000 células C6 de glioblastoma de rata en placas de 96 pozos y se les adicionaron 100 $\mu$ L de medio DMEM advanced al 2.5% de suero bovino fetal.
- 3.- Se dejaron incubando 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 4.- Culminado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se adicionaron 100  $\mu$ L de medio con o sin péptido A $\beta$  a una concentración final de 40 $\mu$ M y de forma independiente control antisentido, rotenona y PBS 1X. Esto se realizó por triplicado.
- 5.- Se incubó por 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 6.- Terminado el tiempo de incubación de las células con los tratamientos se utilizó el kit CellTiter 96 acuoso no radioactivo de la casa comercial Promega, para medir la proliferación celular, siguiendo las indicaciones del fabricante y se les colocó 20 $\mu$ L del reactivo por pozo.
- 7.-Se incubó por 1 hora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>
- 8.- Se realizó la lectura de Absorbancia a 490nm.
- 9.- Se graficaron los resultados obtenidos y se realizó el análisis de los datos empleando la prueba estadística de ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnet.

## Diagrama de flujo de los ensayos de viabilidad celular en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

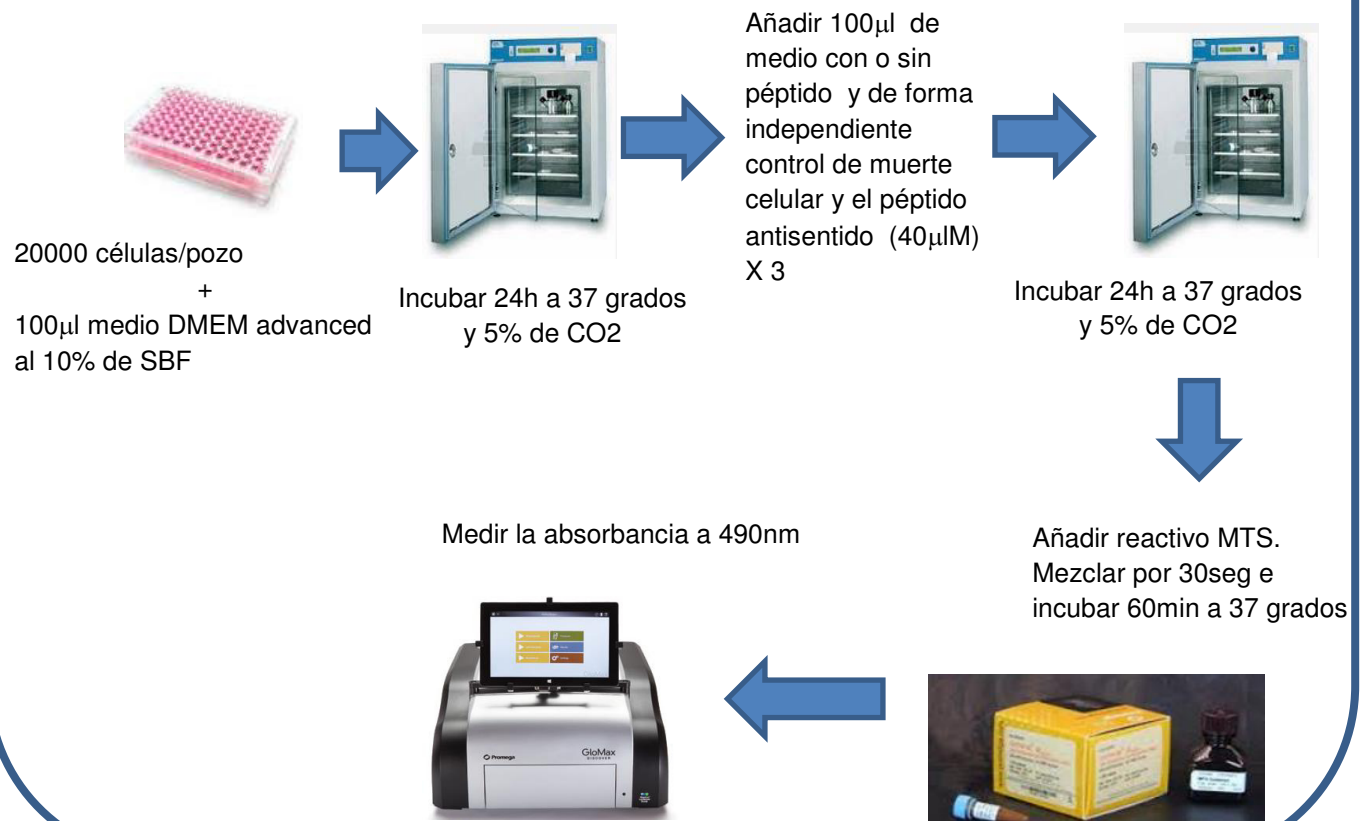


Figura 24: Diagrama de flujo del ensayo de Viabilidad celular con MTS de los péptidos silvestres y mutantes en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

Tabla 10: Lista de los tratamientos empleados en los ensayos de viabilidad celular.

Tratamiento	
Blanco	Células sin tratamiento
Control de muerte celular	Rotenona
T1	A $\beta$ (25-35)wt
T2	A $\beta$ (25-35)K28A
T3	A $\beta$ (25-35)A30W
T4	A $\beta$ (25-35)M35C
T5	A $\beta$ (1-40)wt
T6	A $\beta$ (1-40)K28A
T7	A $\beta$ (1-40) A30W
T8	A $\beta$ (1-40) M35C
T9	A $\beta$ (1-42)wt
T10	A $\beta$ (1-42)A30W
T11	A $\beta$ (1-42)K28A
T12	A $\beta$ (1-42)M35C
T13	A $\beta$ (35-25)



## **5.6 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno**

- 1.- Los péptidos fueron pre-incubados 96 horas a una concentración de 500 $\mu$ M para A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes y para A $\beta$ (1-40) 250 $\mu$ M. Se realizaron 2 experimentos independientes.
- 2.- Se sembraron 20,000 células C6 de glioblastoma de rata en placas de 96 pozos en 70 $\mu$ L de medio DMEM advanced al 2.5% de suero bovino fetal.
- 3.- Se dejaron incubando 18 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 4.- Culminadas las 18 horas de incubación de las células con los tratamientos, se les colocó 20  $\mu$ L de ROS-Glo™ Sustrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del Kit ROS-Glo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la casa comercial Promega, el cual queda a una concentración final de 25 $\mu$ M preparada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- 5.- Se dejó incubando por 6 horas la solución sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 6.- Culminadas las 6 horas de incubación de las células con los tratamientos se les colocó 100  $\mu$ L de ROS-Glo™ Solución de detección preparada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- 7.- Se dejó incubando a condiciones ambientales por 20 minutos y se procedió a leer la luminiscencia.
- 8.- Se graficaron los resultados obtenidos y se realizó el análisis de los datos empleando la prueba estadística de ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnet.

## Diagrama de flujo de los ensayos de Especies Reactivas de Oxígeno en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

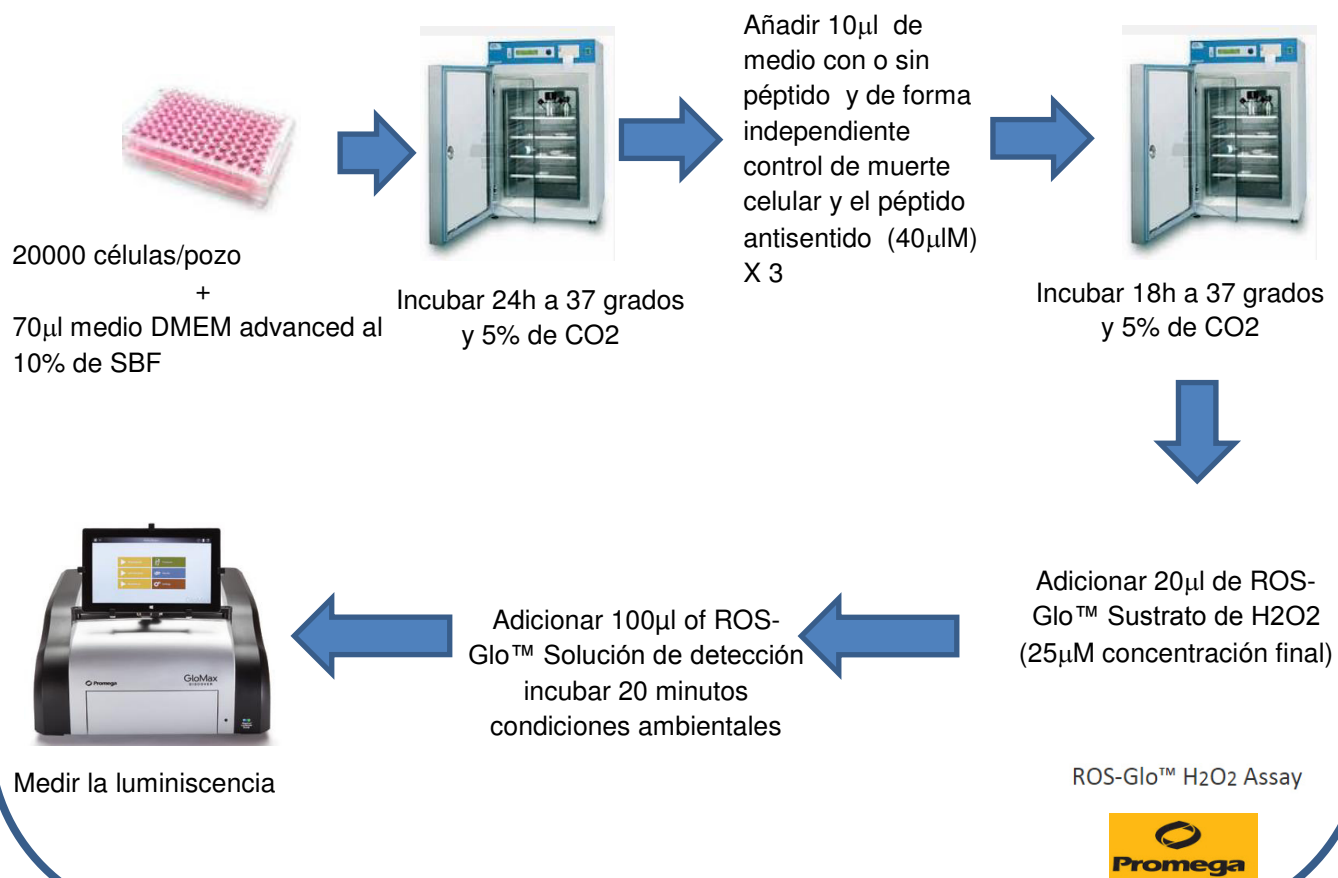


Figura 25: Diagrama de flujo del ensayo de producción de Especies Reactivas de Oxígeno de los péptidos silvestres y mutantes en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

Tabla 10: Lista de los tratamientos empleados en los ensayos de especies reactivas de oxígeno.

Tratamiento	
Blanco	Células sin tratamiento
Control de ROS	H2O2 1mM
T1	A $\beta$ (25-35)wt
T2	A $\beta$ (25-35)K28A
T3	A $\beta$ (25-35)A30W
T4	A $\beta$ (25-35)M35C
T5	A $\beta$ (1-40) <u>wt</u>
T6	A $\beta$ (1-40)K28A
T7	A $\beta$ (1-40) A30W
T8	A $\beta$ (1-40) M35C
T9	A $\beta$ (1-42) <u>wt</u>
T10	A $\beta$ (1-42)A30W
T11	A $\beta$ (1-42)K28A
T12	A $\beta$ (1-42)M35C
T13	AB(35-25)

## CAPÍTULO VI: RESULTADOS

### 6.1 A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes

#### Cinéticas de agregación en presencia de ThS y ANS

Al comparar las cinéticas de agregación de los péptidos A $\beta$  (25-35) silvestre con sus respectivas mutantes existe una diferencia en la agregación con cada fluoróforo empleado. En el caso del fluoróforo ThS, el cual es una sonda intercalante de estructuras ricas en láminas beta, como lo son los agregados amiloides (los cuáles son ricos en estas estructuras) existen patrones de agregación distintos. En el caso de la mutante A30W, a cada uno de los tiempos su agregación es menor que el silvestre. Para la mutante M35C en ciertos tiempos su agregación es menor que el silvestre, pero en los tiempos iniciales es ligeramente mayor la agregación. Y en el caso de la mutante K28A a ciertos tiempos presenta mayor agregación que el silvestre y en otros tiempos menor agregación. Todas las mutantes al tiempo de 96 horas exhiben una menor agregación, especialmente la mutante A30W con respecto al péptido silvestre.

#### Comparación cinéticas de agregación ThS A $\beta$ (25-35)wt y mutantes 40 $\mu$ M

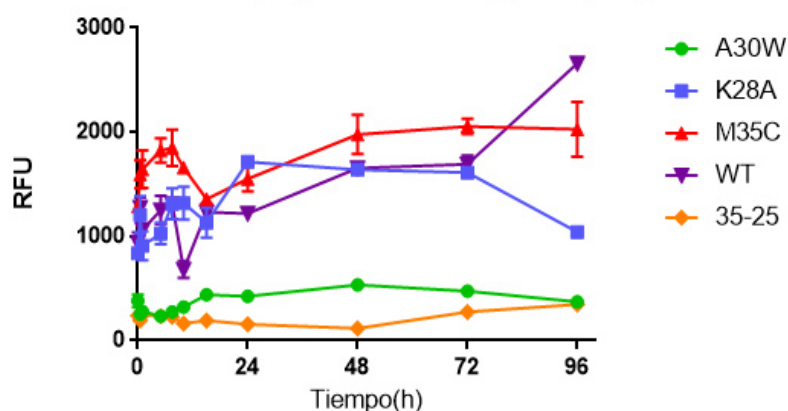


Figura 26: Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ThS (agregados de tipo amiloide) para el fragmento A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF.

En el caso del fluoróforo ANS (el cual nos indica los residuos hidrofóbicos expuestos característicos de agregados amorfos) el péptido silvestre presentó menor cantidad de agregados amorfos en todos los tiempos, y en el caso de la mutante A30W presenta mayor cantidad de estos agregados a tiempos tempranos de la cinética. Sin embargo, a tiempos posteriores de las 15 horas se presenta un aumento de los agregados amorfos por parte de la mutante M35C así como una disminución de los agregados de la mutante A30W. La mutante K28A de manera similar al péptido silvestre fue la mutante que menor respuesta dio al ANS.

**Comparación cinéticas de agregación ANS A $\beta$ (25-35)wt y mutantes 40 $\mu$ M**

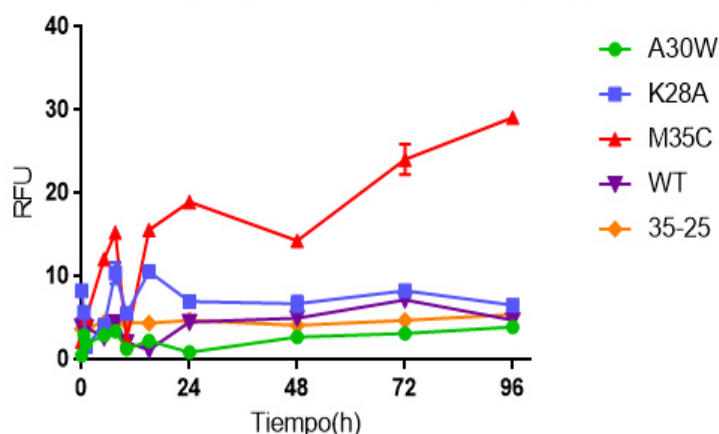


Figura 27: Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ANS (agregados de tipo amorfo) para el fragmento A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de UR.

La proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo fue diferente entre las mutantes con respecto al silvestre; el péptido A $\beta$ (25-35) silvestre generó en mayor proporción agregados de tipo amiloide en comparación con los agregados amorfos y esto resulta ser significativo. En el caso de la mutante A30W, en comparación con el silvestre y las demás mutantes, fue la que menos generó agregados de tipo amiloide y amorfos.

La mutante K28A generó mayor proporción de agregados amiloides en comparación con los agregados amorfos con respecto a la misma mutante pero estos siguen siendo menores que el péptido silvestre.

En el caso de la mutante M35C, fue la mutante que generó mayor proporción de agregados de tipo amorfo esto con respecto al silvestre y con respecto a la misma mutante generó menos agregados de tipo amiloide y esto resulta estadísticamente significativo.

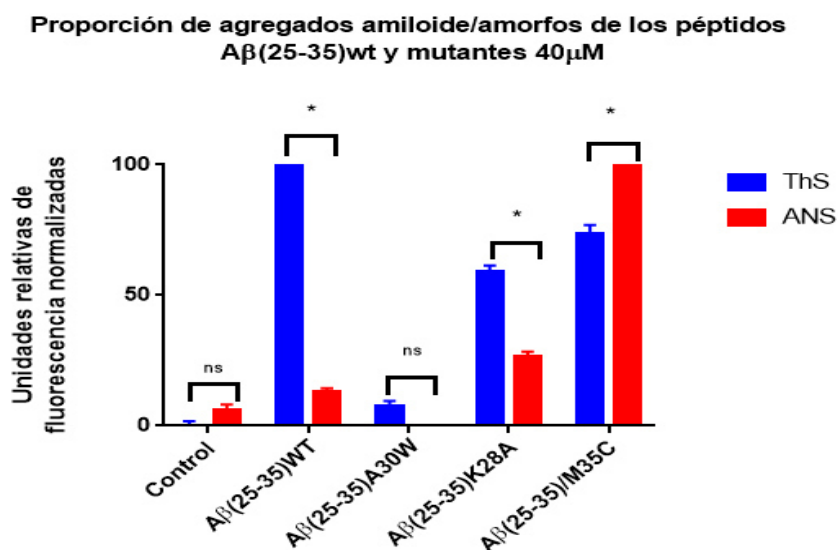


Figura 28: Representación gráfica de la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo para el fragmento A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF normalizados. Pruebas estadísticas ANOVA y comparaciones múltiples significancia  $p > 0.05$ .

### 6.1.2 Co-incubación de mutantes agregadas con péptido silvestre

Péptido A $\beta$  (25-35)wt-(25-35)A30W (25:5)

Para observar el efecto que producen las mutantes agregadas sobre el péptido silvestre se llevó a cabo una co-incubación y la cinética de agregación con el fluoróforo ThS.

En la siguiente gráfica se observa la cinética de A $\beta$  (25-35)wt; al compararla con la cinética obtenida de la co-incubación de la mutante A30W y el silvestre se

observa cómo la agregación comienza a disminuir a partir de las 15 horas y en el caso del tiempo de 96 horas se aprecia mas claro esta disminución en la agregación.

Cinética de agregación ThS  $A\beta(25-35)_{wt}$  co incubado con  $A\beta(25-35)A30W$  25:5

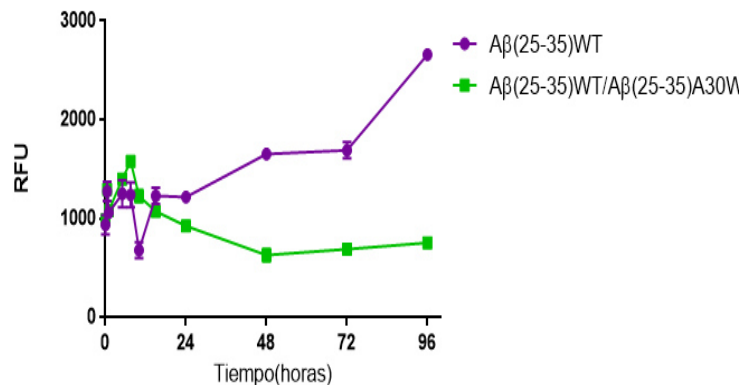


Figura 29: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido  $A\beta(25-35)$  silvestre co incubado con la mutante  $A\beta(25-35)A30W$  previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.

#### Péptido $A\beta(25-35)_{wt}-(25-35)K28A$ (25:5)

En el caso de la co-incubación del péptido silvestre con la mutante K28A a las 15 horas empieza una disminución estadísticamente significativa en la agregación del péptido silvestre co incubado con la mutante y posterior a esta hora empieza a disminuir aún más la agregación y para las 96 horas hubo una disminución de hasta 5 veces la agregación del péptido silvestre.

Cinética de agregación ThS A $\beta$ (25-35)wt co incubado con A $\beta$ (25-35)K28A 25:5

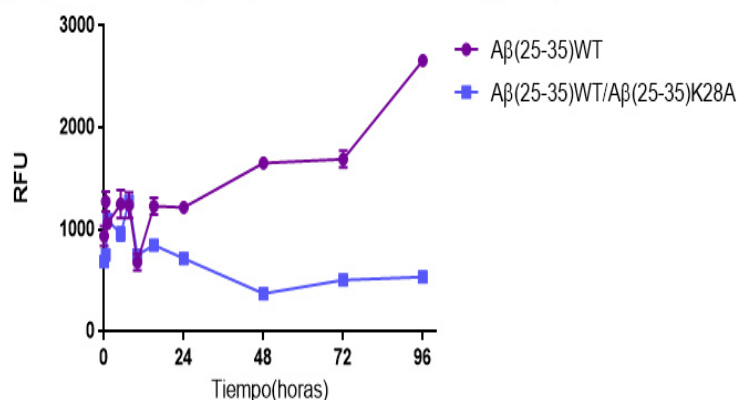


Figura 30: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co-incubado con la mutante A $\beta$ (25-35)K28A previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.

#### Péptido A $\beta$ (25-35)wt-(25-35)M35C (25:5)

En el caso de la co-incubación del péptido silvestre con la mutante M35C se presenta un punto a las 10 horas de mayor agregación con respecto al silvestre de hasta 4 veces mayor, al igual que lo sucedido con la mutante A30W también a tiempos posteriores de las 15 horas empieza a disminuir la agregación del péptido silvestre

Cinética de agregaciónThS A $\beta$ (25-35)wt co incubado con A $\beta$ (25-35)M35C 25:5

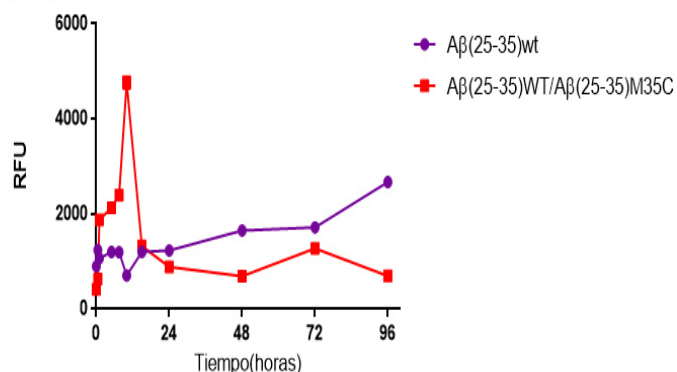


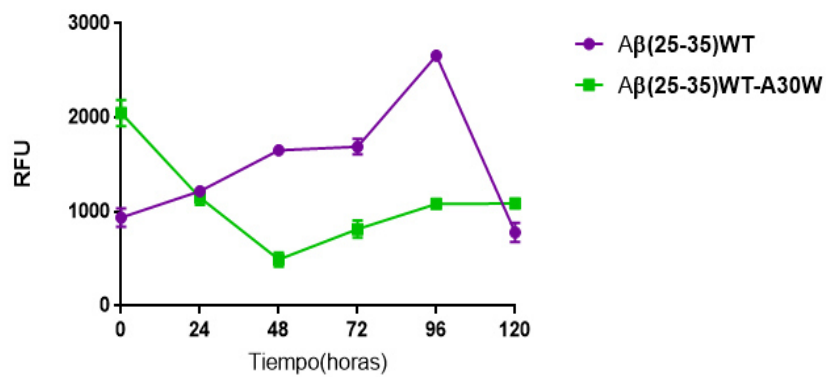
Figura 31: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre co incubado con la mutante A $\beta$ (25-35)M35C previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.



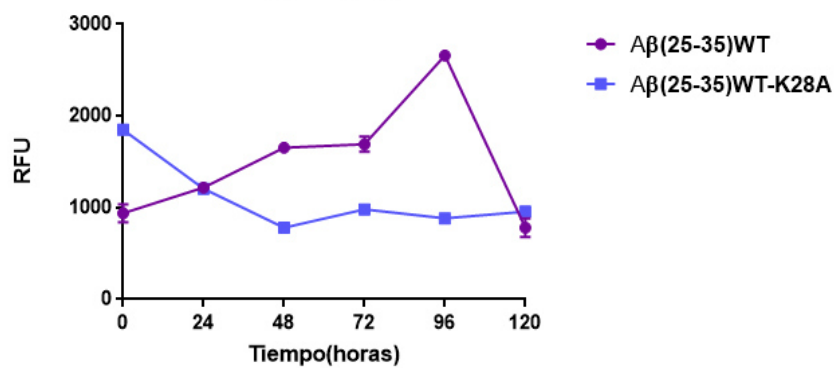
### 6.1.3 Co-incubación de mutantes con péptido silvestre agregado

Posteriormente, se evaluó si alguna de las mutantes tenía la capacidad de disminuir la agregación del péptido silvestre previamente agregado. Las mutantes de A $\beta$ (25-35) lograron disminuir la agregación del péptido desde las 24 horas, y el análisis estadístico demuestra que esta disminución en la agregación es significativa.

Coincubación A $\beta$ (25-35)wt - A $\beta$ (25-35)A30W 25:5  
wild type agregado



Coincubación A $\beta$ (25-35)wt - A $\beta$ (25-35)K28A 25:5  
wild type agregado



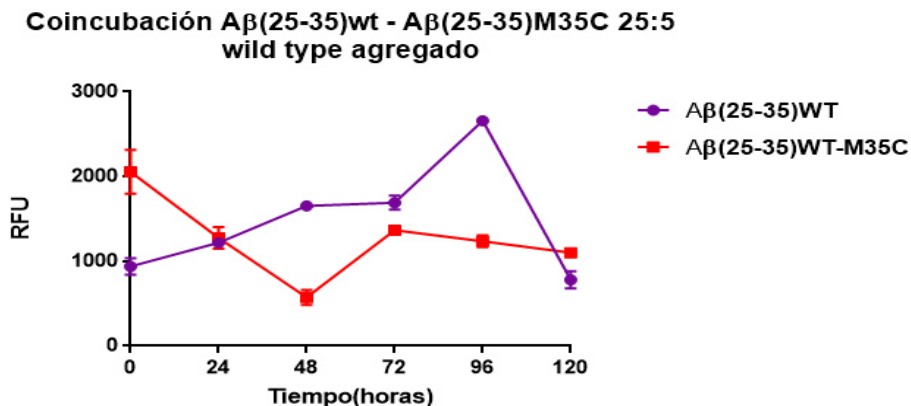


Figura 32: Compendio de las gráficas de las cinéticas de agregación del péptido A $\beta$ (25-35) silvestre previamente agregado co-incubado con las mutantes A30W,K28A,M35C en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado/ mutante.

#### 6.1.4 Viabilidad celular de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

Se evaluó la viabilidad celular de las mutantes y los péptidos silvestres, no se encontró diferencia significativa entre las variantes A $\beta$ (25-35) A $\beta$ (A30W), A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (M35C), en la viabilidad celular de la línea celular C6. A $\beta$ (25-35) silvestre obtuvo una viabilidad celular 66.5% y las mutantes obtuvieron valores de viabilidad parecidos al silvestre (A $\beta$ (A30W) 65.95%, A $\beta$ (K28A) 62.95% A $\beta$ (M35C) 64.92%).

**Gráfica de Viabilidad celular A $\beta$ (25-35)wt y variantes 40 $\mu$ M**

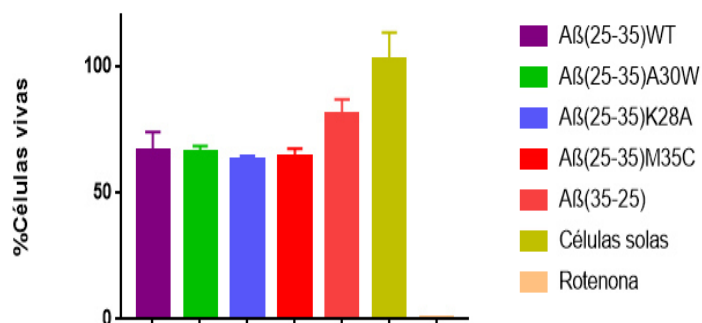


Figura 33: Gráfica de viabilidad celular de A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de muerte celular se empleó Rotenona a una concentración del 1  $\mu$ M.

### 6.1.5 Producción de Especies reactivas de oxígeno de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

Con respecto a la producción de especies reactivas de oxígeno hubo un aumento por parte de la variante de A $\beta$ (25-35)K28A en la línea celular C6, la cual resulta ser estadísticamente significativa, esto con respecto al péptido silvestre.

Producción de Especies Reactivas de Oxígeno A $\beta$ (25-35)wt y variantes 40 $\mu$ M

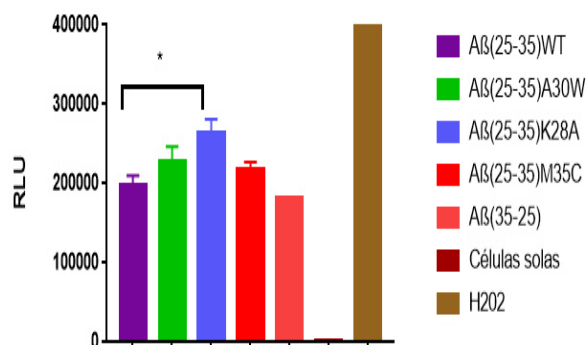


Figura 34: Gráfica de ERO A $\beta$ (25-35) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de producción de ERO se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración del 500  $\mu$ M .

## 6.2 A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes

### 6.2.1 Cinéticas de agregación en presencia de ThS y ANS

En el caso del péptido A $\beta$  (1-40) silvestre con el fluoróforo ThS exhibe una cinética de agregación menor que todas las mutantes en cada tiempo de la cinética. La mutante A30W en casi todos los tiempos con excepción de las 10 y 96 horas presenta una cinética de agregación mayor que el péptido silvestre y las demás mutantes.

En el tiempo de 10 horas, la mutante M35C exhibe mayor agregación que la mutante A30W y aún mayor con respecto al silvestre, y a las 96 horas la mutante K28A presentó un aumento de hasta 3 veces en la agregación con respecto a las mutantes M35C, A30W y el péptido silvestre.

Comparación cinéticas de agregación ThS A $\beta$ (1-40)wt y mutantes 40 $\mu$ M

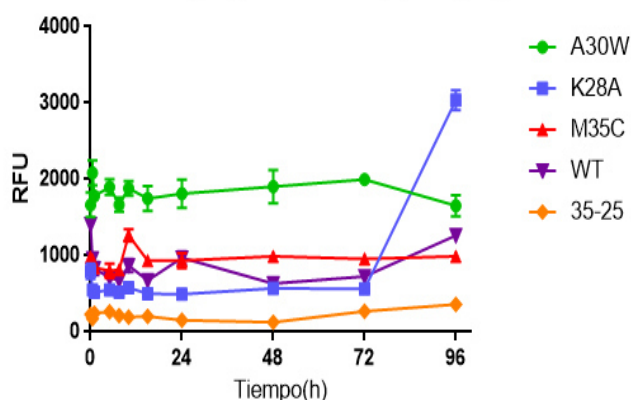


Figura 35: Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ThS (agregados de tipo amiloide) para el fragmento A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes, todos a una concentración de 40 $\mu$ M.

En el caso del fluoróforo ANS, el péptido silvestre a inicios tempranos exhibe menor formación de agregados amorfos, sin embargo, a tiempos finales y, especialmente a las 72 horas, hay un gran aumento en la formación de estos agregados. Con respecto a las mutantes, M35C presenta en todos los tiempos menor presencia de agregados amorfos en comparación con A30W y K28A.

### Comparación cinética de agregación ANS A $\beta$ (1-40)wt y mutantes 40 $\mu$ M

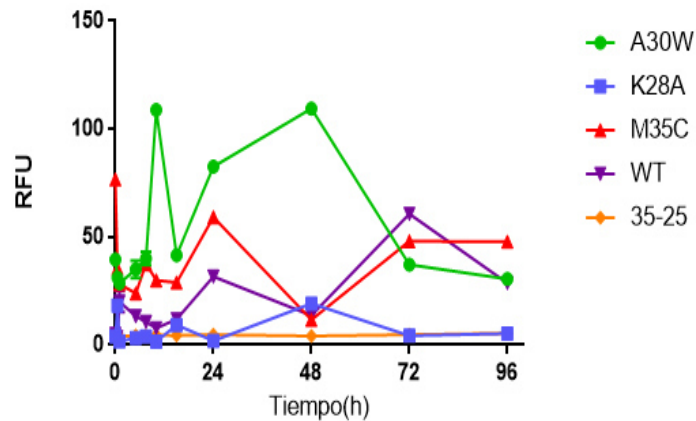


Figura 36: Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ANS (agregados de tipo amorfo) para el fragmento A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes, todos a una concentración de 40 $\mu$ M.

La proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo fue diferente entre las mutantes con respecto al silvestre; el péptido A $\beta$ (1-40) silvestre generó menor proporción de agregados de tipo amiloide y mayor agregados de tipo amorfo bajo nuestras condiciones experimentales, y esto es estadísticamente significativo.

La mutante A30W generó mayor agregados de tipo amorfo que de amiloide y esto resultó significativo; mientras que la mutante K28A generó mayor cantidad de agregados de tipo amiloide que de amorfos y resultó ser significativo. La mutante M35C no mostró una diferencia significativa en la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo.

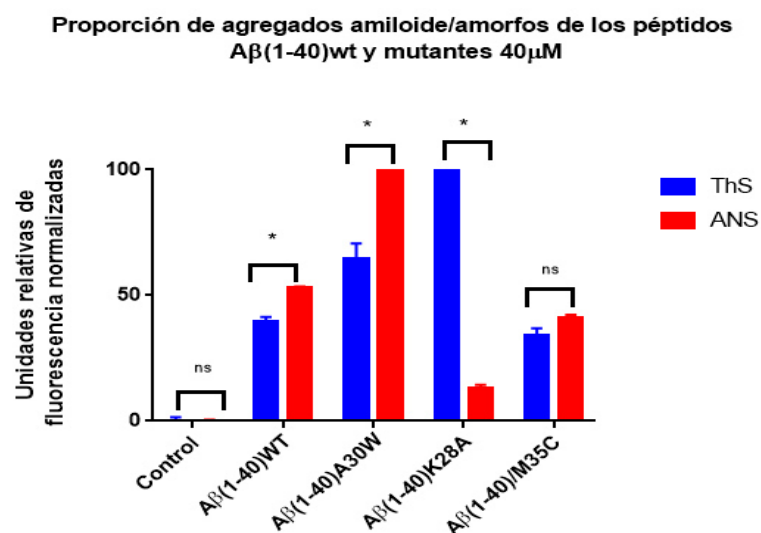


Figura 37: Representación gráfica de la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo para el fragmento A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF normalizados. Pruebas estadísticas ANOVA y comparaciones múltiples significancia  $p > 0.05$ .

### 6.2.2 Co-incubación de mutantes agregadas con péptido silvestre

Péptido A $\beta$  (1-40)wt-(1-40)A30W (25:5)

En el caso del péptido A $\beta$ (1-40) co-incubado con la mutante A30W, se observó una disminución significativa de hasta 3 veces menor en la agregación del péptido silvestre a tiempos posteriores de la cinética.

Cinética de agregación ThS  $A\beta(1-40)$ wt co incubado con  $A\beta(1-40)A30W$  25:5

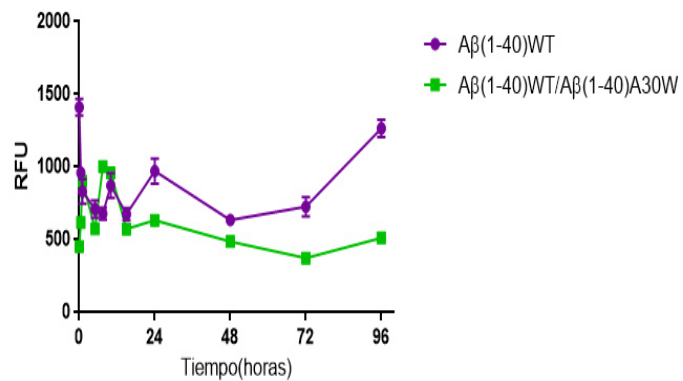


Figura 38: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido  $A\beta(25-35)$  silvestre co-incubado con la mutante  $A\beta(1-40)A30W$  previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.

#### Péptido $A\beta(1-40)wt-(1-40)K28A$ (25:5)

En la co-incubación del péptido  $A\beta(1-40)$  a inicios de la cinética de agregación el péptido silvestre empieza a aumentar su agregación desde las 10 horas, la cual va aumentando conforme transcurre la cinética y a tiempos finales se aumenta la agregación del péptido hasta 3 veces por parte de la mutante K28A previamente agregada.

Cinética de agregación ThS  $A\beta(1-40)wt$  co incubado con  $A\beta(1-40)K28A$  25:5

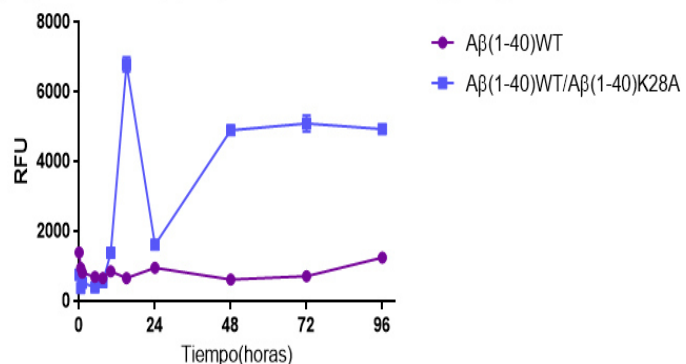


Figura 39: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido  $A\beta(25-35)$  silvestre co-incubado con la mutante  $A\beta(1-40)K28A$  previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.

### Péptido A $\beta$ (1-40)wt-(1-40)M35C (25:5)

En la co-incubación del péptido A $\beta$ (1-40) con la mutante M35C desde el inicio de la cinética la agregación del péptido silvestre aumenta en comparación a la cinética del péptido silvestre, y este aumento en la agregación por parte de la mutante en el silvestre se mantiene durante toda la cinética.

Cinética de agregación ThS A $\beta$ (1-40)wt co incubado con A $\beta$ (1-40)M35C 25:5

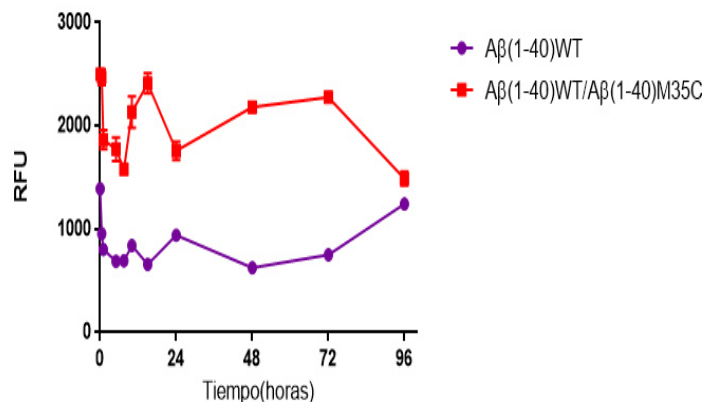


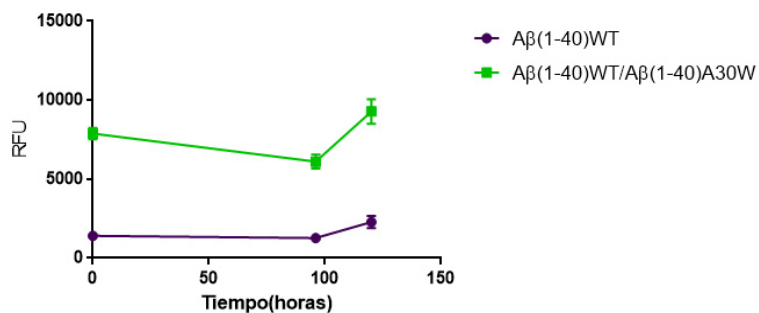
Figura 40: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (1-40) silvestre co-incubado con la mutante A $\beta$ (1-40)M35C previamente agregada en una proporción 25:5 péptido silvestre mutante.

### 6.2.3 Co incubación de mutantes con péptido silvestre agregado

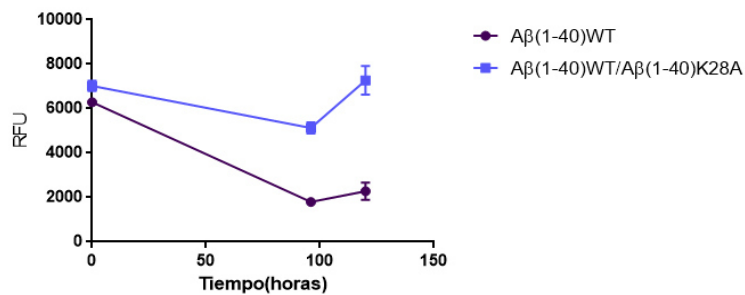
Posteriormente, se evaluó si alguna de las mutantes tenía la capacidad de disminuir la agregación del péptido silvestre previamente agregado. Las mutantes de A $\beta$ (1-40) no lograron disminuir la agregación del péptido, sino al contrario, la potenciaron, esto bajo nuestras condiciones experimentales



**Coincubación  $A\beta(1-40)_{wt}$  -  $A\beta(1-40)_{A30W}$  25:5  
wild type agregado**



**Coincubación  $A\beta(1-40)_{wt}$  -  $A\beta(1-40)_{K28A}$  25:5  
wild type agregado**



**Coincubación  $A\beta(1-40)_{wt}$  -  $A\beta(1-40)_{M35C}$  25:5  
wild type agregado**

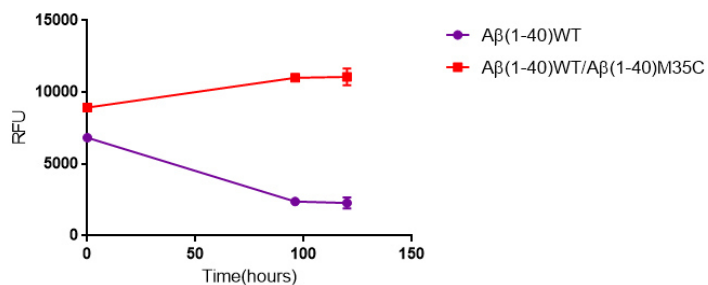


Figura 41: Compendio de las gráficas de las cinéticas de agregación del péptido  $A\beta(1-40)$  silvestre previamente agregado co-incubado con las mutantes A30W, K28A, M35C en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado/ mutante

#### 6.2.4 Viabilidad celular de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

En el caso del péptido A $\beta$ (1-40) silvestre y sus distintas mutantes, se encontró una diferencia significativa entre las variantes A $\beta$ (1-40) A $\beta$ (A30W), A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (M35C) en la viabilidad celular de la línea celular C6. A $\beta$ (1-40) silvestre obtuvo una viabilidad celular 36.08% y las mutantes A $\beta$ (A30W) 62.55%, A $\beta$ (K28A) 87.56% A $\beta$ (M35C) 88.48%

Gráfica de Viabilidad celular A $\beta$ (1-40)wt y variantes 40 $\mu$ M

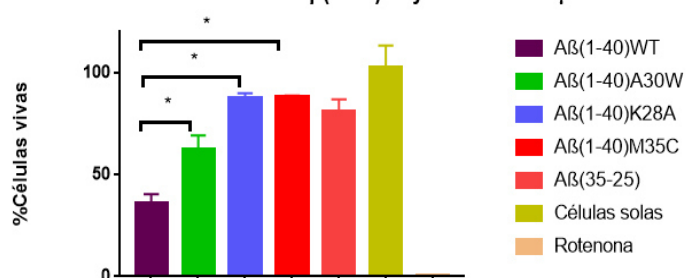


Figura 42: Gráfica de viabilidad celular de A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de muerte celular se empleó Rotenona a una concentración del 1  $\mu$ M.

#### 6.2.5 Producción de especies reactivas de oxígeno de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

Las variantes de A $\beta$ (1-40)A30W y A $\beta$ (M35C) produjeron menor cantidad de ERO con respecto al silvestre en la línea celular C6, la cual resulta ser estadísticamente significativa y estos resultados correlacionan con los obtenidos en viabilidad celular por parte de estas mutantes (resultaron con mayor viabilidad celular).

Producción de Especies Reactivas de Oxígeno A $\beta$ (1-40)wt y variantes 40 $\mu$ M

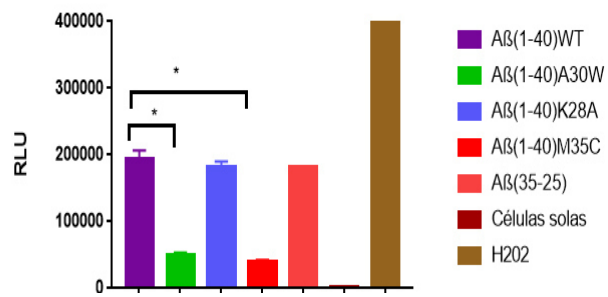


Figura 43: Gráfica de ERO A $\beta$ (1-40) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de producción de ERO se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración del 500  $\mu$ M .

### 6.3 A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes

#### 6.3.1 Cinéticas de agregación en presencia de ThS y ANS

En el caso del péptido A $\beta$  (1-42) silvestre con el fluoróforo ThS exhibe una cinética de agregación mayor que todas las mutantes en cada tiempo de la cinética. La mutante A30W en casi todos los tiempos presenta una cinética de agregación menor que el péptido silvestre y las demás mutantes, y parece tener un patrón de generación de agregados de tipo amiloide que repuntaba cada 7.5 horas desde el inicio hasta antes de las 24 horas. La mutante K28A empezó con una cinética de agregación menor que el silvestre, la cual aumentó a las 48 y 72 horas y al termino de esta disminuyó con respecto al silvestre. En el caso de la mutante M35C, siempre mostró una cinética de agregación menor que el silvestre.

Comparación cinéticas de agregación ThS A $\beta$ (1-42)wt y mutantes 40 $\mu$ M

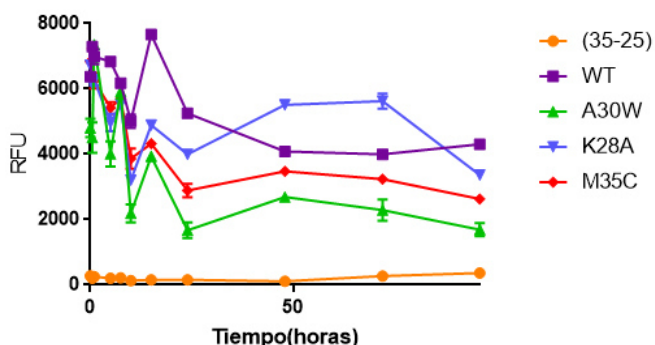


Figura 44: Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ThS (agregados de tipo amiloide) para el fragmento A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M.

En el caso del fluoróforo ANS, el péptido silvestre a inicios tempranos exhibe menor formación de agregados amorfos. Con respecto a las mutantes, estas generaron mayor cantidad de agregados de tipo amorfo en comparación al silvestre pero lo hicieron de distinta manera. La mutante M35C presentó una formación de agregados de tipo amorfo de hasta 10 veces mayor a las 15 horas con respecto al silvestre, y esta disminuyó a las 24 horas y en los tiempos

posteriores se mantuvo constante. La mutante A30W desde las 24 horas hasta el término de la cinética generó mayor cantidad de agregados de tipo amorfo con respecto al silvestre y fue la mutante que a las 96 horas, generó mayor agregados amorfos. En cuanto a la mutante K28A, esta también exhibió una cinética de agregados amorfos mayor que el silvestre, sin embargo, fue menor que la mutante A30W.

**Comparación cinéticas de agregación ANS A $\beta$ (1-42)wt y mutantes 40 $\mu$ M**

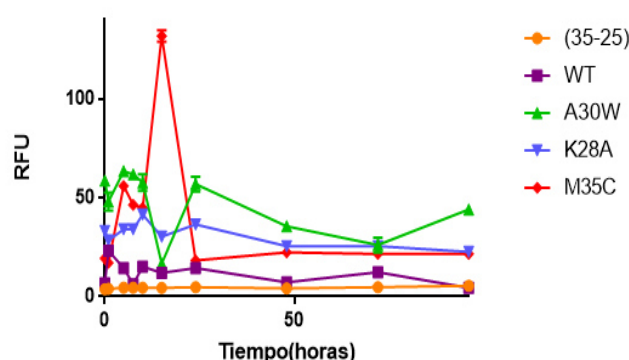


Figura 45: Representación gráfica de la comparación de las cinéticas de agregación en presencia de ANS (agregados de tipo amorfo) para el fragmento A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M.

La proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo fue diferente entre las mutantes con respecto al silvestre; el péptido A $\beta$ (1-42) silvestre generó menor proporción de agregados de tipo amiloide y mayor agregados de tipo amorfo bajo nuestras condiciones experimentales, y esto es estadísticamente significativo. Las mutantes tuvieron un comportamiento similar en la generación de agregados de tipo amiloide, sin embargo, el comportamiento para los agregados de tipo amorfo difirió en las mutantes con respecto al silvestre. La mutante M35C mostró mayor formación de agregados de tipo amorfo con respecto a las demás mutantes y el silvestre; en seguida la mutante A30W, y la que generó menor proporción fue K28A, pero aún así generaron mas agregados amorfos que el silvestre. La proporción entre los agregados de tipo amiloide/amorfo en las mutantes resultó ser estadísticamente significativa

donde sólo la mutante M35C obtuvo mayor proporción de agregados de tipo amorfo con respecto a los amiloides; A30W y K28A obtuvo menor proporción de agregados de tipo amorfo con respecto a los amiloides y esto fue estadísticamente significativo.

Proporción de agregados amiloides/amorfos de A $\beta$ (1-42)wt y mutantes 40 $\mu$ M

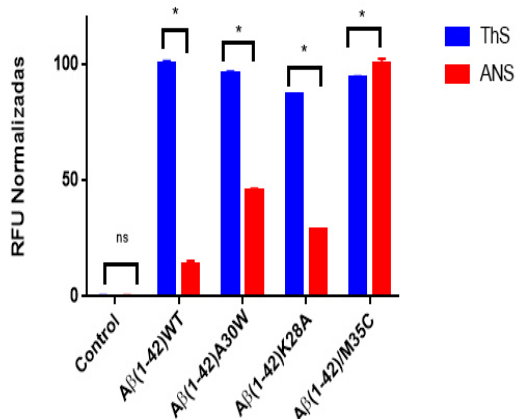
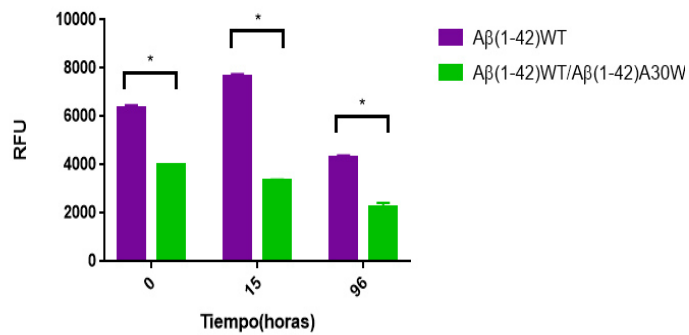


Figura 46: Representación gráfica de la proporción de agregados de tipo amiloide/amorfo para el fragmento A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes todos a una concentración de 40 $\mu$ M con valores de URF normalizados. Pruebas estadísticas ANOVA y comparaciones múltiples significancia  $p > 0.05$ .

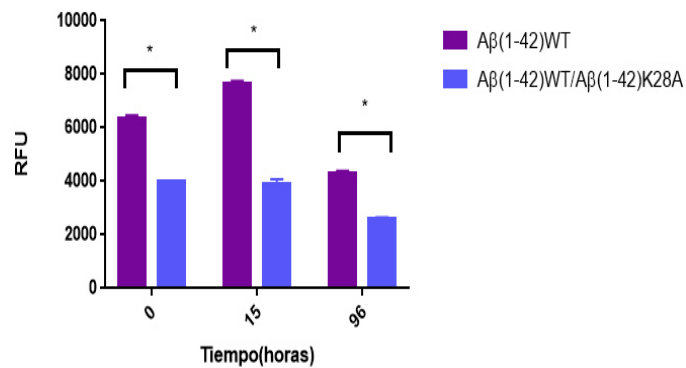
### 6.3.2 Co-incubación de mutantes agregadas con péptido silvestre

En la co-incubación del péptido A $\beta$ (1-42) con las mutantes agregadas se observó la disminución en la agregación del péptido silvestre por parte de las mutantes a los tiempos 0, 15 y 96 horas y esto resultó ser estadísticamente significativo. A las 15 horas que fue el punto de mayor agregación amiloide del péptido silvestre se observa cómo las mutantes A30W y K28A disminuyeron la agregación casi en un 50%, mientras que la mutante M35C la disminuyó sólo en un 25%.

Coincubación A $\beta$ (1-42)wt - A $\beta$ (1-42)A30W agregada proporción 25:5



Coincubación A $\beta$ (1-42)wt - A $\beta$ (1-42)K28A agregada proporción 25:5



Coincubación A $\beta$ (1-42)wt - A $\beta$ (1-42)M35C agregada proporción 25:5

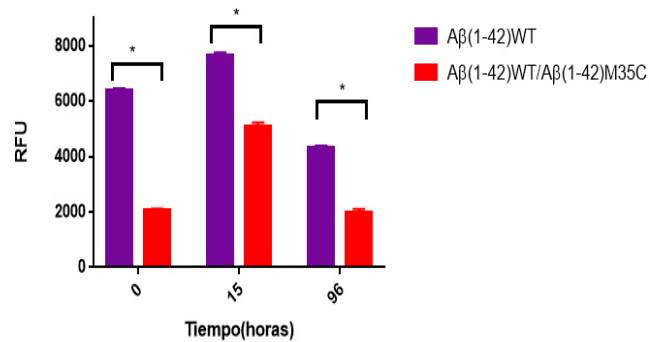
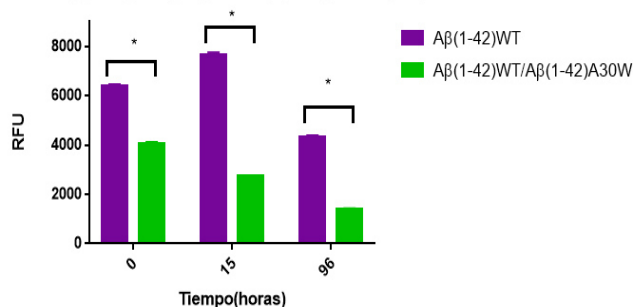


Figura 47: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (1-42) silvestre co-incubado con las mutantes A30W,K28A,M35C previamente agregadas en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado/ mutante

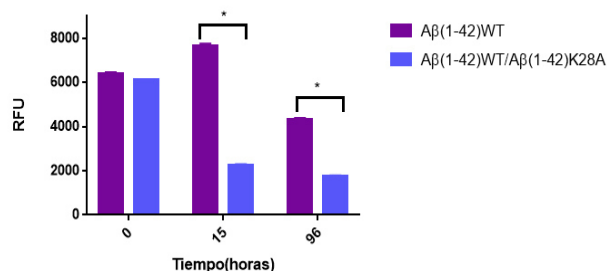
### 6.2.3 Co incubación de mutantes con péptido silvestre agregado

Posteriormente, se evaluó si alguna de las mutantes tenía la capacidad de disminuir la agregación del péptido silvestre previamente agregado. Las mutantes de A $\beta$ (1-42) lograron disminuir la agregación del péptido, esto bajo nuestras condiciones experimentales. La mutante A30W logró disminuir la agregación desde el tiempo inicial en comparación con K28A y M35C.

Coincubación A $\beta$ (1-42)wt agregado - A $\beta$ (1-42)A30W proporción 25:5



Coincubación A $\beta$ (1-42)wt agregado - A $\beta$ (1-42)K28A proporción 25:5



Coincubación A $\beta$ (1-42)wt agregado - A $\beta$ (1-42)M35C proporción 25:5

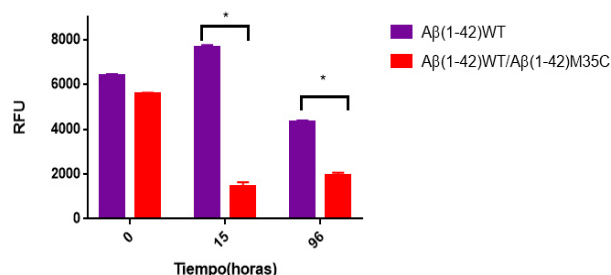


Figura 48: Representación gráfica de la cinética de agregación del péptido A $\beta$ (1-42) silvestre previamente agregado co-incubado con las mutantes A30W, K28A, M35C en una proporción 25:5 péptido silvestre agregado/ mutante.



#### 6.3.4 Viabilidad celular de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

En el caso del péptido A $\beta$ (1-42) silvestre y sus distintas mutantes, se encontró una diferencia significativa entre las variantes A $\beta$ (1-42) A $\beta$ (K28A) y A $\beta$ (M35C) en la viabilidad celular de la línea celular C6. A $\beta$ (1-42) silvestre obtuvo una viabilidad celular 35.11% y las mutantes A $\beta$ (A30W) 46.54%, A $\beta$ (K28A) 57.33% A $\beta$ (M35C) 100.91%

Gráfica de Viabilidad celular A $\beta$ (1-42)wt y variantes 40 $\mu$ M

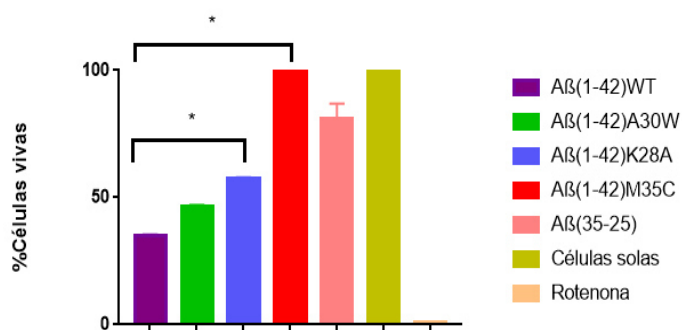


Figura 49: Gráfica de viabilidad celular de A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de muerte celular se empleó Rotenona a una concentración del 1  $\mu$ M.

#### 6.3.5 Producción de especies reactivas de oxígeno de los péptidos amiloides en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

Las variantes de A $\beta$ (1-42)A30W y A $\beta$ (K28A) produjeron ERO de manera similar con respecto al silvestre en la línea celular C6, A $\beta$ (M35C) fue la mutante que menor ROS generó. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en viabilidad celular por parte de esta mutante (resultaron con mayor viabilidad celular).

### Producción de Especies Reactivas de Oxígeno A $\beta$ (1-42)wt y variantes 40 $\mu$ M

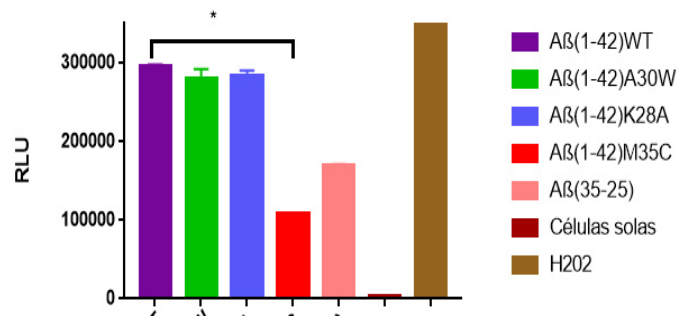


Figura 50: Gráfica de ERO A $\beta$ (1-42) silvestre y mutantes a una concentración de 40 $\mu$ M. Control de producción de ERO se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración del 500  $\mu$ M .

## CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

La mutante A $\beta$ (25-35)-A30W es la que generó menor proporción de agregados de tipo amiloide en comparación al péptido silvestre. A $\beta$ (25-35)-K28A y A $\beta$ (25-35)-M35C presentaron una formación de estos agregados similar al péptido silvestre.

La exposición de residuos hidrofóbicos fue mayor en la mutante A $\beta$ (25-35)-M35C, seguido de A $\beta$ (25-35)-K28A; aunque esta a ciertos tiempos con respecto al péptido silvestre el cual no generó exposición de residuos hidrofóbicos.

La formación de agregados tipo amiloide fue similar con la excepción de A $\beta$ (1-40)-A30W, la cual es mayor y a las 96 horas hubo un aumento de hasta 4 veces en la formación de agregados por parte de A $\beta$ (1-40)-K28A.

La proporción de residuos hidrofóbicos expuestos fue mayor en la mutante A $\beta$ (1-40)-A30W en comparación con el péptido silvestre. A $\beta$ (1-40)-K28A no generó residuos hidrofóbicos expuestos durante la cinética.

La formación de agregados tipo amiloide por parte de las mutantes de A $\beta$ (1-42) fue similar, todas tuvieron una cinética de agregación menor que el péptido silvestre. A $\beta$ (1-42)-A30W fue la que tuvo la formación de agregados tipo amiloide más baja de las tres mutantes. A $\beta$ (1-42)-K28A presentó un aumento de agregados amiloides con respecto al silvestre a las 24 y 48 horas los cuales disminuyeron a los tiempos posteriores.

La proporción de residuos hidrofóbicos expuestos fue mayor en la mutante A $\beta$ (1-42)-A30W, en comparación con el péptido silvestre en los tiempos posteriores a las 15 horas. A $\beta$ (1-42)-M35C generó hasta 10 veces más agregados de tipo amorfo a las 15 horas en comparación al silvestre. A $\beta$ (1-42) no generó residuos hidrofóbicos expuestos durante la cinética.

Las mutantes A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (A30W) y A $\beta$ (M35C) de A $\beta$ (25-35) a tiempos largos de coincubación disminuyen la agregación y presencia de agregados amiloides del péptido silvestre, por lo que parece que actúan como inhibidores.

La mutante A $\beta$ (M35C) de A $\beta$ (25-35), a las 10 horas de incubación, aumenta la formación de agregados amiloides (inestables) en el péptido silvestre al ser coincubada, y estos disminuyen a tiempos posteriores.

Las mutantes A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (M35C) de A $\beta$ (1-40)wt bajo nuestras condiciones experimentales favorecen la agregación del péptido silvestre y la mutante A $\beta$ (A30W) disminuye la formación de agregados amiloides en el péptido silvestre.

Las mutantes A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (A30W) y A $\beta$ (M35C) de A $\beta$ (25-35) disminuyen la agregación del péptido silvestre agregado bajo nuestras condiciones experimentales.

Las mutantes agregadas A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (A30W) y A $\beta$ (M35C) de A $\beta$ (1-42) disminuyen la agregación del péptido silvestre bajo nuestras condiciones experimentales.

Las mutantes A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (A30W) y A $\beta$ (M35C) de A $\beta$ (1-42) disminuyen la agregación del péptido silvestre agregado bajo nuestras condiciones experimentales.

No se encontró diferencia significativa entre las variantes A $\beta$ (25-35) A $\beta$ (A30W), A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (M35C), en la viabilidad celular de la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

Se encontró una diferencia significativa entre las variantes A $\beta$ (1-40) A $\beta$ (A30W), A $\beta$ (K28A), A $\beta$ (M35C) en la viabilidad celular de la línea celular C6 de glioblastoma de rata. Las mutantes evitaron la disminución de la viabilidad celular con respecto al silvestre.

Las variantes de A $\beta$ (1-42) A $\beta$ (K28A) y A $\beta$ (M35C) evitaron la disminución de la viabilidad celular con respecto al silvestre en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

La mutante A $\beta$ (25-35)-K28A generó un aumento de 25%, en comparación con el silvestre, en la producción de ERO en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

Las variantes de A $\beta$ (1-40) A $\beta$ (A30W) y A $\beta$ (M35C) disminuyeron la producción de ERO en un 75% en comparación con el péptido silvestre.

La variante de A $\beta$ (1-42), A $\beta$ (M35C), disminuyó la producción de ERO en un 60% en comparación con el péptido silvestre.

## CAPÍTULO IX: DISCUSIÓN

La investigación de la Enfermedad de Alzheimer se ha enfocado en el estudio de uno de los rasgos más característicos de la patología, las placas seniles; estas se componen principalmente de depósitos del péptido A $\beta$  y es por esta principal característica que años más tarde surgió la hipótesis de la cascada del amiloide centrando el origen de la enfermedad en el péptido A $\beta$  (170-171).

Experimentos posteriores encontraron una ausencia de correlación entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad y la cantidad de placas seniles. Aún más desconcertante era el hecho que se encontró muerte neuronal en pacientes con la enfermedad en regiones del cerebro donde no existían placas de A $\beta$  e inclusive se han encontrado en individuos sanos (172-173).

En el estudio exhaustivo para comprender la naturaleza del péptido A $\beta$  y su relación con el origen de la Enfermedad de Alzheimer hoy en día se han encontrado formas oligoméricas solubles de A $\beta$  que se forman durante el proceso de agregación del mismo y estas especies parecen ser clave en la patología de la enfermedad. Esto ya que experimentos previos han demostrado generar déficit cognitivo en la ausencia de placas seniles (174).

El descubrimiento de esta correlación entre las formas oligoméricas solubles de A $\beta$  y el déficit cognitivo producto de la muerte neuronal, aparentemente causada por estas especies, ha sido de gran impacto tanto que hoy en día existe un cambio de paradigma en el enfoque para el estudio del origen de la EA y se centra en estos oligómeros de A $\beta$  (175).

Una vez que es generado A $\beta$ , sufre cambios en su estructura secundaria  $\alpha$ -hélice a una rica en láminas  $\beta$  la cual genera un proceso de agregación y de formación de fibrillas así como también de los oligómeros solubles. Estos cambios estructurales están íntimamente ligados con la secuencia aminoacídica de A $\beta$  y a las interacciones que tienen los aminoácidos intra e interpéptido (176-177).

La búsqueda de nuevas terapias que tiene como enfoque reducir o incluso evitar el depósito del A $\beta$  empleando moléculas pequeñas que tengan la capacidad de unirse al péptido y así evitar su agregación. Es en esta dirección donde se propone el empleo de péptidos derivados de la misma secuencia de A $\beta$ , esto debido a la propia naturaleza del péptido para auto-ensamblarse, y auto-reconocerse. Y es con este enfoque que se han obtenido ya fragmentos derivados de A $\beta$  con modificaciones estructurales que evitan la formación de agregados fibrilares neurotóxicos (178-179).

Para el presente estudio, decidimos modificar la secuencia del péptido A $\beta$  con mutaciones puntuales (A30W, K28A y M35C) en sitios que parecen ser claves en el proceso de agregación, y al realizar estas modificaciones estructurales pudieran intervenir en la agregación del péptido A $\beta$ .

Existen estudios donde se ha modificado la secuencia del péptido A $\beta$ , pero estas modificaciones han sido en fragmentos cortos, como lo son el fragmento A $\beta$  (25-35), el hexapéptido KLVFFA, (180) y en otros casos fragmentos mas largos, A $\beta$  (14-23), e incluso las modificaciones estructurales donde cambian ciertos aminoácidos por sus formas enantioméricas (181), añaden grupos metilo en ciertas posiciones (182) y así intervenir en la agregación de A $\beta$ . Pero no hay reportes en donde la misma modificación estructural sea evaluada tanto en el fragmento mas tóxico, A $\beta$  (25-35), como en la secuencia aminoacídica completa A $\beta$  (1-40); resaltando esto debido a que los individuos afectados por la enfermedad tienen una mezcla de los fragmentos de A $\beta$ , no solamente uno de ellos y poder observar si la misma mutación puntual realizada, afecta la cinética de agregación tanto en el fragmento mas tóxico A $\beta$  (25-35) como en los fragmentos mas largos A $\beta$  (1-40) A $\beta$  (1-42).

Es el primer reporte del uso de la ThS como sonda de agregados amiloides. A pesar de que el mecanismo de unión de ThT esta muy bien caracterizado y estudiado, (183-184) se decidió usar ThS debido a experimentos previos. Fue la sonda, que bajo nuestras condiciones experimentales, proporcionó mayor señal en las cinéticas de agregación. Esto puede deberse a las condiciones

experimentales que fueron empleadas en este estudio, ya que se sabe que las cinéticas de agregación de A $\beta$  presentan falta de homogeneidad (185).

Las mutantes diseñadas para este estudio tuvieron un comportamiento distinto en las cinéticas de agregación con ambas sondas (ThS, ANS), en los dos fragmentos de A $\beta$  silvestres y de manera distinta dependiendo el fragmento, lo cual nos indica que los aminoácidos en esas posiciones al ser sustituidos alteran la cinética de agregación del péptido silvestre.

La mutante A $\beta$ (A30W) en A $\beta$ (25-35), generó menor cantidad de agregados de tipo amiloide en comparación con el silvestre; en el caso de A $\beta$ (1-40), la mutante obtuvo mayor proporción de agregados de tipo amiloide con respecto al silvestre y para el fragmento A $\beta$ (1-42) mostró una cinética de agregados amiloides menor que el silvestre en todos los tiempos. El comportamiento distinto de la mutante en los tres fragmentos puede deberse a varios factores, el primero de ellos es que A $\beta$ (1-40) contiene casi toda la secuencia aminoacídica de A $\beta$ , y por ende el efecto del cambio de Alanina por Triptofano pudo atenuarse, pero no en el fragmento A $\beta$ (1-42) y la segunda posibilidad yace en que bajo nuestras condiciones experimentales A $\beta$ (1-40) generó menor cantidad de agregados de tipo amiloide y en el caso de A $\beta$ (1-42) ocurrió lo contrario, generó mayor cantidad de agregados de tipo amiloide.

En el caso de la co-incubación de la mutante previamente agregada con los péptidos silvestres monoméricos para ver si esta podía modular la agregación de los mismos, se observó que en A $\beta$ (25-35) y A $\beta$ (1-42) evitaban la agregación y lograban disminuir la agregación del péptido silvestre agregado; en A $\beta$ (1-40), la mutante agregada actuó de la misma manera evitando la agregación, sin embargo, aumentó la agregación del péptido silvestre agregado.

La mutante A $\beta$ (A30W) en los ensayos de viabilidad en la línea celular C6 de glioblastoma de rata en comparación con A $\beta$ (25-35) y A $\beta$ (1-42) silvestre no presentó una diferencia significativa en cuanto a la viabilidad celular, pero en A $\beta$ (1-40) logró un aumento de hasta dos veces en la viabilidad, y esto se



correlacionó con lo obtenido en los ensayos de especies reactivas de oxígeno donde esta mutante generó menos en comparación al silvestre y resultó ser estadísticamente significativo. No existe reporte en donde la Alanina en esta posición de A $\beta$  halla sido sustituida, y como podemos observar ,esta sustitución en A $\beta$ (1-40) evitó que las células de la línea C6 murieran y además, generó menor cantidad de especies reactivas de oxígeno con respecto al silvestre.

Se sabe que la Lisina en las posiciones 16 y 28 parece tener un papel importante en el ensamblaje y agregación de A $\beta$ . Nuestra mutante A $\beta$ (K28A), en el fragmento A $\beta$ (25-35), generó menor cantidad de agregados de tipo amiloide en comparación con el silvestre; en el caso de A $\beta$ (1-40), la mutante generó hasta 2 veces más cantidad de agregados de tipo amiloide con respecto al silvestre, y para A $\beta$ (1-42), no hubo un efecto tan significativo en la formación de agregados de tipo amiloide ni amorfo en comparación con el silvestre. Existe un reporte donde llevaron a cabo la misma mutación de Lisina por Alanina en el mismo fragmento (186), sin embargo, no lograron concluir el efecto de esta mutación debido a problemas de solubilidad por parte de la mutante.

Otro reporte de Yoshiike y colaboradores (187), utilizaron una triple mutante para Arg5, Lys16, y Lys28 por Alaninas en la línea celular HEK293, y como resultados obtuvieron una pérdida significativa de toxicidad inducida por las fibrillas. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado, ya que en nuestras cinéticas de agregación esta mutante, a pesar de que bajo nuestras condiciones experimentales en el fragmento A $\beta$ (1-40) obtuvo mayor proporción de agregados de tipo amiloide y que durante la co-incubación del péptido silvestre con la mutante parecía actuar como potenciador de la agregación, en los experimentos de viabilidad celular, esta mutante logró un aumento del doble en la viabilidad celular con respecto al silvestre. Aunque en la producción de especies reactivas de oxígeno no hubo ni aumento ni disminución de estas. Y para A $\beta$ (1-42) solamente se observó un aumento en la viabilidad celular con respecto al silvestre, pero no fue estadísticamente significativo.

La Metionina es uno de los aminoácidos que más fácilmente se oxidan, esto genera una reacción en cadena, la cual culmina en la generación de especies reactivas de oxígeno en las células (188). Es por esto que se ha propuesto el rol de la Metionina en la posición 35 de A $\beta$  como una pieza clave en la generación de toxicidad

En nuestro trabajo seguimos la misma vertiente en cuanto al estudio de este aminoácido y nos dimos a la tarea de investigar qué sucedía en los fragmentos A $\beta$ (25-35), A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) sustituyendo la Metionina por Cisteína. La mutante A $\beta$ (M35C) en A $\beta$ (25-35) generó menor cantidad de agregados de tipo amiloide en comparación con el silvestre y obtuvo mayor cantidad de agregados de tipo amorfo en comparación con el silvestre y, las demás mutantes. En el caso de A $\beta$ (1-40), la mutante generó hasta 2 veces más cantidad de agregados de tipo amiloide con respecto al silvestre y en contraste con la mutante en el fragmento A $\beta$ (25-35), casi no generó agregados de tipo amorfo bajo nuestras condiciones experimentales. Para el fragmento A $\beta$ (1-42) la mutante generó mayor cantidad de agregados de tipo amorfo con respecto al silvestre y las otras mutantes; disminuyó la producción de ROS un 60% y evitó la pérdida de la viabilidad celular en un 100% en comparación con el silvestre.

La mutante agregada en A $\beta$ (25-35) evitó la agregación del péptido y logró disminuir la agregación del mismo previamente agregado, a pesar de que en A $\beta$ (1-40) la mutante parecía actuar como potenciador de la agregación, en los experimentos de viabilidad celular esta mutante logró un aumento el doble la viabilidad celular esto con respecto al silvestre. Y en la producción de especies reactivas de oxígeno obtuvo una disminución estadísticamente significativa. Para el fragmento A $\beta$ (1-42) la mutante co-incubada evitó la agregación del péptido silvestre y logró disminuir la agregación del silvestre agregado. Estos resultados concuerdan con reportes (Jiang et al., 2007) que han sustituido esta Metionina por Cisteína en donde han observado que en experimentos *in vitro* esta sustitución atenúa la toxicidad de A $\beta$  y la producción de ERO.

## **CAPÍTULO X: PERSPECTIVAS**

Se plantean como perspectivas determinar la citotoxicidad y generación de ERO en cultivo primario de neuronas así como la detección de los oligómeros empleando geles desnaturalizantes; aislar los oligómeros individuales y determinar su peso molecular por Espectrometría de Masas, determinar las características estructurales de los oligómeros empleando Microscopía de Fuerza Atómica y finalmente, determinar el efecto de los agregados *in vivo* sobre el cerebro de rata.

## CAPÍTULO XI: BIBLIOGRAFÍA

1. W.W. Barker, C. A. Luis, A. Kashuba, M. Luis, D. G. Harwood, D. Loewenstein, C. Waters, P. Jimison, E. Shepherd, S. Sevush, N. Graff-Radford, D. Newland, M. Todd, B. Miller, M. Gold, K. Heilman, L. Doty, I. Goodman, B. Robinson, G. Pearl, D. Dickson, R. Duara. (2002). Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 16, 203–212.
2. A. Alzheimer. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr.* 64, 146–148.
3. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* Dec 17;366(9503):2112–7.
4. Herrup K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci* 30: 16755-16762.
5. Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GY, MacKnight C et al. (2008). Diagnosis and treatment of dementia: Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *CMAJ* 178: 548-556.
6. Wang HX, Karp A, Winblad B, Fratiglioni L. (2002). Late-life engagement in social and leisure activities is associated with a decreased risk of dementia: a longitudinal study from the Kungsholmen project. *Am J Epidemiol* 155: 1081-1087.
7. Xu, W., C. Ferrari, and H.-X. Wang. (2013) Epidemiology of Alzheimer's Disease.
8. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* Dec 17;366(9503):2112–7.

9. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*;7(3):137-152.
10. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, et al. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population- based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* ;54(11 Suppl 5):S4-9.
11. Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, et al.(2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* 7(9):812-826.
12. Korczyn AD, Vakhapova V. (2007). The prevention of the dementia epidemic. *J Neurol Sci* 257(1-2):2-4.
13. World Health Organization y Alzheimer's Disease International. (2012). Dementia:a public health priority. Recuperado de <http://www.who.int>
14. Alzheimer's Disease International. (2009). Informe Mundial sobre el Alzheimer. Recuperado de <https://www.alz.co.uk>
15. Francesconi P, Roti L, Casotto V, Lauretani F, Lamponi M, Bandinelli S et al. (2006). Prevalence of dementia in Tuscany: results from four population-based epidemiological studies. *Epidemiol Prev* July;30(4-5):237-44
16. Herrup K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci* 30: 16755-16762.
17. Seltzer B, Sherwin I.(1983). A comparison of clinical features in early- and late-onset primary degenerative dementia. One entity or two? *Arch Neurol*;40:143–146
18. Smits LL, Pijnenburg YA, Koedam EL, van der Vlies AE, Reuling IE, Koene T, Teunissen CE, Scheltens P, van der Flier WM.(2012). Early onset Alzheimer's disease is associated with a distinct neuropsychological profile. *J Alzheimers Dis*;30:101–108.

19. Herrmann N, O'Regan J, Ruthirakuhan M, Kiss A, Eryavec G, Williams E, Lanctôt KL. (2015). A Randomized Placebo-Controlled Discontinuation Study of Cholinesterase Inhibitors in Institutionalized Patients With Moderate to Severe Alzheimer Disease. *J Am Med Dir Assoc*. S1525-8610(15)00558-7.
20. Buiza C, Montorio-Cerrato I, Yanguas J. (2015). The validity and reliability of the Spanish version of the Severe Cognitive Impairment Profile (SCIP) for the cognitive assessment of persons with advanced stages of Alzheimer's disease. *Rev Neurol*. 16;61(8):349-56.
21. Zhang D1, Wang Y, Zhou L, Yuan H, Shen D. (2011). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Multimodal classification of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neuroimage*. Apr 1;55(3):856-67.
22. Shaffer JL1, Petrella JR, Sheldon FC, Choudhury KR, Calhoun VD, Coleman RE, Doraiswamy PM. (2013). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Predicting cognitive decline in subjects at risk for Alzheimer disease by using combined cerebrospinal fluid, MR imaging, and PET biomarkers. *Radiology*. 2013 Feb;266(2):583-91.
23. Tanzi and Bertram. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* 120: 545–555
24. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, et al. (1996). Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2: 864–870
25. Rademakers R, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2003). Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *ScientificWorldJournal*. 2003 Jun 16;3:497-519.
26. Mahley R. W., Weisgraber K. H., Huang Y. (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5644–5651

27. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. (1993). Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 90: 1977–1981
28. Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L., Pericak-Vance M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923
29. Myers R. H., Schaefer E. J., Wilson P. W., D'Agostino R., Ordovas J. M., Espino A., Au R., White R. F., Knoefel J. E., Cobb J. L., McNulty K. A., Beiser A., Wolf P. A. (1996) Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology* 46, 673–677
30. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CAF, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, et al. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci* 102: 13461–13466
31. Kehoe PG, Russ C, McIlroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, et al. (1999). Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet* 21: 71–72
32. Kamboh MI. (2004). Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Genet. Jul*; 68(Pt 4):381-404.
33. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) in Alzheimer cytoskeletal pathology *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, pp. 4913–4917

34. K.S. Kosik, C.L. Joachim, D.J. Selkoe. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83 pp. 4044–4048.
35. Salvatore Oddo et ál. (2004). Amyloid- $\beta$  immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated  $\tau$  aggregates via the proteasome. Neuron;43:321-332.
36. M. Goedert, M.G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron, 3 pp. 519–526.
37. A. Himmler, D. Drechsel, M.W. Kirschner, D.W. Martin Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains Mol. Cell. Biol., 9 pp. 1381–1388
38. Kolarova M1, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. Int J Alzheimers Dis;2012:731526
39. K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P.A. Merz, G.Y. Wen, S.S. Shaikh, H.M. Wisniewski, I. Alafuzoff, B. (1986). Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. Lancet, 2 pp. 421–426
40. M. Goedert, M.G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron, 3 pp. 519–526.
41. Kolarova M1, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. Int J Alzheimers Dis;2012:731526



42. A. Himmler, D. Drechsel, M.W. Kirschner, D.W. Martin Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains *Mol. Cell. Biol.*, pp. 1381–1388
43. K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P.A. Merz, G.Y. Wen, S.S. Shaikh, H.M. Wisniewski, I. Alafuzoff, B. Winblad. (1986). Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease *Lancet*, 2, pp. 421–426
44. A. del C. Alonso, A. Mederlyova, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations *J. Biol. Chem.*, 279 pp. 34878–34881
45. S. Khatoon, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal. (1992). Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* Aug; 59(2):750-3
46. Kolarova M1, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis*;2012:731526
47. Joanna F. McCarter, Sabine Liebscher, Teresa Bachhuber, Claudia Abou-Ajram, Mark Hübener, Bradley T. Hyman, Christian Haass, Melanie Meyer-Luehmann. (2013). Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2013 August; 126(2): 179–188.
48. Alex E. Roher, David H. Cribbs, Ronald C. Kim, Chera L. Maarouf, Charisse M. Whiteside, Tyler A. Kokjohn, Ian D. Daus, Elizabeth Head, Carolyn Liebsack, Geidy Serrano, Christine Belden, Marwan N. Sabbagh, and Thomas G. Beach. (2013). Bapineuzumab Alters A $\beta$  Composition: Implications for the Amyloid Cascade Hypothesis and Anti-Amyloid Immunotherapy. *PLoS One*; 8(3): e59735.

49. Joanna F. McCarter, Sabine Liebscher, Teresa Bachhuber, Claudia Abou-Ajram, Mark Hübener, Bradley T. Hyman, Christian Haass, Melanie Meyer-Luehmann. (2013). Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2013 August; 126(2): 179–188.
50. Christian K. E. Jung, Kevin Keppler, Sonja Steinbach, Lidia Blazquez-Llorca, Jochen Herms. (2015). Fibrillar Amyloid Plaque Formation Precedes Microglial Activation *PLoS One*; 10(3).
51. Anna Pensalfini, Ricardo Albay, III, Suhail Rasool, Jessica Wu, Asa Hatami, Hiromi Arai, Lawrence Margol, Saskia Milton, Wayne Poon, Maria Corrada, Claudia Kawas, Charles Glabe. (2014). Intracellular amyloid and the neuronal origin of Alzheimer neuritic plaques. *Neurobiol Dis.* 2014 November; 0: 53–61
52. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar HA, et al. (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26: 7212–7221.
53. Shun Chen, Xuemei Ge, Yinghui Chen, Nan Lv, Zhenguo Liu, and Weien Yuan. (2013). Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 117–125.
54. Guo W, Wang Z, Li H, Wiese M, Zheng H. (2011). APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell Res* Jul 19.
55. Joshi P, Liang JO, DiMonte K, Sullivan J, Pimplikar SW. (2009). Amyloid precursor protein is required for convergent-extension movements during Zebrafish development. *Developmental Biology* 355: 1–11.
56. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, et al. (2007). The secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein ectodomain APPs $\alpha$  is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *The Journal of Neuroscience* 27(29): 7817–7826.

57. Ina Coburger, Sven O. Dahms, Dirk Roeser, Karl-Heinz Gührs, Peter Hortschansky, Manuel E. (2013). Analysis of the Overall Structure of the Multi-Domain Amyloid Precursor Protein (APP). PLoS One. 2013 Dec 4;8(12).
58. Loredana Spoerri, Laura J. Vella, Chi L. L. Pham, Kevin J. Barnham, Roberto Cappai. (2012). The Amyloid Precursor Protein Copper Binding Domain Histidine Residues 149 and 151 Mediate APP Stability and Metabolism. J Biol Chem. August 3; 287(32): 26840–26853.
59. Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., Sakaki, Y.(1991). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. Gene 87: 257-263, 1990.
60. Dermaut B, Cruts M, Slooter AJ, Van Gestel S, De Jonghe C, Vanderstichele H, et al. (1999). The Glu318Gly substitution in presenilin 1 is not causally related to Alzheimer disease. Am J Hum Genet;64:290-2
61. Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, Wisniewski HM. (1985). Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. Neurology 35:957-61
62. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, et al. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. Nat Genet;38:24-6.
63. Theuns J, Van Broeckhoven C.(2000). Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. Hum Mol Genet 9:2383-94.
64. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Frangione B, Rostagno A, Ghiso J. (2009). Acta Neuropathol. (2009) Jul;118(1):115-30.
65. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature 2012;488:96–99.

66. Di Fede G, Catania M, Morbin M, et al. (2009). A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* 2009;323:1473–1477
67. Alessandro Biffi, et al. *J Clin* . (2011). Mutations in the APP gene and their relationship to the amino acid sequence of the A $\beta$  peptide. APP: amyloid precursor protein. Alessandro Biffi, et al. *J Clin Neurol*. 2011 March;7(1):1-9.
68. Rochette MJ, Murphy MP. (2002). Gamma-Secretase: substrates and inhibitors. *Mol Neurobiol*. 2002;26:81–95.
69. Sato T, Diehl TS, Narayanan S, Funamoto S, Ihara Y, De Strooper B, Steiner H, Haass C, Wolfe MS. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J BiolChem*. 2007;282:33985–33993
70. Li YM, Xu M, Lai MT, Huang Q, Castro JL, DiMuzio-Mower J, Harrison T, Lellis C, Nadin A, Neduvellil JG, Register RB, Sardana MK, Shearman MS, Smith AL, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. (2000). Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*. 2000;405:689–694
71. Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Sudhof T, Yu G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 2005;122:435–447.
72. Zhou et al., 2005 S. Zhou, H. Zhou, P.J. Walian, B.K. Jap(2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, pp. 7499–7504
73. A.Y. Kornilova, F. Bihel, C. Das, M.S. Wolfe (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, pp. 3230–3235
74. Suzuki N, Cheung TT, Cai X-D, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. (1994). An increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein is secreted by familial amyloid  $\beta$  protein precursor (BAPP717) mutants. *Science*. 1994;264:1336–1340

75. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999;286:735–741
76. Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, Vassar R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem*. 2000;275:20647–20651.
77. Marcinkiewicz M, Seidah NG. (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem*. 2000;75:2133–2143
78. Huang SM, Mouri A, Kokubo H, Nakajima R, Suemoto T, Higuchi M, Staufenbiel M, Noda Y, Yamaguchi H, Nabeshima T, Saido TC, Iwata N. (2006). Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem*. 2006;281:17941–17951
79. Lloyd A, Demetrius, Pierre J, Magistretti, and Luc Pellerin. (2015). Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Front Physiol*. 2014; 5: 522.
80. Golde, T. E., Schneider, L. S. & Koo, E. H. (2011). Anti-A $\beta$  therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron* 69, 203–213.
81. Uday Saxena PhD (2010) Alzheimer's disease amyloid hypothesis at crossroads: where do we go from here?, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14:12.
82. Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary

tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 1985;4:2757–2763

83. Lahiri DK, Maloney B. (2010). Beyond the signaling effect role of amyloid- $\beta$ 42 on the processing of A $\beta$ PP, and its clinical implications. *Exp. Neurol.* 225 (1): 51–4.

84. Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. (2010). Signaling Effect of Amyloid- $\beta$ 42 on the Processing of A $\beta$ PP. *Exp. Neurol.* 221 (1): 18–25.

85. Baruch-Suchodolsky R, Fischer. (2009). Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry* 48 (20).

86. Serrano-Pozo A, Forsch M.P, Masliah E, Hyman B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*

87. Jae-Eun Kang, Miranda M. Lim, Randall J. Bateman, James J. Lee, Liam P. Smyth, John R. Cirrito, Nobuhiro Fujiki, Seiji Nishino, and David M. Holtzman (2009). Amyloid- $\beta$  Dynamics are Regulated by Orexin and the Sleep-Wake Cycle. *Science.* 2009 Nov 13; 326(5955): 1005–1007.

88. Saitoh T, Sundsmo M, Roch J, Ximura M, Cole G, Schubert D, et al.(1989). Secreted form of amyloid p protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 1989; 58:615–622.

89. Goodman Y, Mattson MP.(1994). Secreted forms of p-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 1994; 128:1–12.

90. Greenberg S, Koo E, Selkoe D, Qiu W, Kosik K. (1994). Secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein stimulates MAP-kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7104–7108.

91. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid p protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990; 250:279–282.

92. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003; 37:925–937.
93. Atwood CS, Huang X, Moir RD, Bacarra NM, Romano D, Tanzi RE, et al. (1998). Dramatic aggregation of Alzheimer A $\beta$  by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 1998; 273:12821–1286
94. Chan CW, Dharmarajan A, Atwood CS, Huang X, Tanzi RE, Bush AI, Martins RN. (1999). Anti-apoptotic action of Alzheimer A $\beta$ . *Alzheimer's Reports* 1999; 2:1–6.
95. Raby CA, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Stabel MD, Watson MD, Evans LM, et al. (1998). Traumatic brain injury increases  $\beta$ -amyloid peptide 1–42 74. in cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1998; 71:2505–2509.
96. Nunomura A, Perry G, Pappolla RP, Friedland RP, Hirai K, Chiba S, et al. (2000). Neuronal oxidative stress precedes amyloid- $\beta$  deposition in Down syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59:1011–1017.
97. Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, et al. (1999). Amyloid-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 1999; 274:25945–25952.
98. Selkoe, D. J. (1991) *Neuron* 6, 487–498 97 y 98
99. Glabe, C. C. (2005) *Subcell. Biochem.* 38, 167–177
100. Balbach J, Petkova A, Oyler N, Antzutkin O, Gordon D, et al. (2002) Supramolecular structure in full-length alzheimer's beta-amyloid fibrils: Evidence for a parallel beta-sheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 83: 1205–1216.
101. Sathish Kumar and Jochen Walter. (2011). Phosphorylation of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*. 2011 Aug; 3(8): 803–812.

102. Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., and Lansbury, P. T. (1997) *Chem. Biol.* 4, 119–125
103. Anguiano, M., Nowak, R. J., and Lansbury, P. T., Jr. (2002) *Biochemistry* 41,1133811343
104. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6448-53
105. Lambert MP, Velasco PT, Viola KL, Klein WL. (2009). Targeting generation of antibodies specific to conformational epitopes of amyloid beta-derived neurotoxins. *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets.*2009;8:65–81. [PubMed]
106. Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature.* 2009;457:1128–1132.
107. Kaminsky Y.G., Marlatt M.W., Kosenko E.A.(2010). Subcellular and metabolic examination of amyloid- $\beta$  peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for A $\beta$ (25-35) *Exp. Neurol.* 2010;221:26–37.
108. Pike C.J., Burdick D., Cotman C.W. (1993). Neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* 1993;13:1676–1687
109. Wei G.; Shea J.-E. (2006). Effects of solvent on the structure of the Alzheimer amyloid- $\beta$ (25–35) peptide. *Biophys. J.* 91, 1638–1647.
110. Shanmugam G.; Jayakumar R. (2004) Structural analysis of amyloid beta peptide fragment (25–35) in different microenvironments. *Biopolymers* 76, 421–434



111. Fezoui Y.; Hartley D.-M.; Harper J.-D.; Khurana R.; Walsh D.-M.; Condron M.-M.; Selkoe D.-J.; Lansbury P.-T.; Fink A.-L.; Teplo D.-B. (2000) An improved method of preparing the amyloid P-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid* 7, 166–178.
112. Chiti F., Dobson C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2006;75:333–366. (Glenner and Wong, 1984; Masters et al., 1985).
113. Panda PK, Patil AS, Patel P, Panchal H.(2016). Mutation-based structural modification and dynamics study of amyloid beta peptide (1–42): An in-silico-based analysis to cognize the mechanism of aggregation. *Genom Data.* 2016 Mar; 7: 189–194.
114. Glenner G.G., Wong C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;120:885–890.
115. I. Casserly, E. Topol. (2004). Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins *Lancet*, 363, pp. 1139–1146.
116. Michael W. Weiner, Dallas P. Veitch, Paul S. Aisen, Laurel A. Beckett, Nigel J. Cairns, Robert C. Green, Danielle Harvey, Clifford R. Jack, William Jagust, Enchi Liu, John C. Morris, Ronald C. Petersen, Andrew J. Saykin, Mark E. Schmidt, Leslie Shaw, Judith A. Siuciak, Holly Soares, Arthur W. Toga, and John Q. Trojanowskiq. (2012). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Review. *Alzheimers Dement.* 2012 Feb; 8(1 0): S1–68.
117. T. Wyss-Coray. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*, 12, pp. 1005–1015.
118. G. Tibolla, G.D. Norata, C. Meda, et al. (2010). Increased atherosclerosis and vascular inflammation in APP transgenic mice with apolipoprotein E deficiency *Atherosclerosis*, 210, pp. 78–87.

119. V. Vukic, D. Callaghan, D. Walker, et al. (2009). Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway *Neurobiol Dis*, 34, pp. 95–106.
120. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. & Beyreuther, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4245–4249.
121. Kirschner, D. A., Abraham, C. & Selkoe, D. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83,503–507
122. Torok, M., Milton, S., Kaye, R., Wu, P., McIntire, T., Glabe, C. G. & Langen, R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 40810–40815
123. Kheterpal, I., Williams, A., Murphy, C., Bledsoe, B. & Wetzel, R. (2001) *Biochemistry*40, 11757–11767
124. Seilheimer, B., Bohrmann, B., Bondolfi, L., Muller, F., Stuber, D. & Dobeli, H. (1997)*J. Struct. Biol.* 119, 59–71
125. Bohrmann, B., Adrian, M., Dubochet, J., Kuner, P., Muller, F., Huber, W., Nordstedt, C. & Dobeli, H. (2000) *J. Struct. Biol.* 130, 232–246
126. Bieler, S. & Soto, C. (2004) *Curr. Drug Targets* 5, 553–558.
127. Steinerman JR, Irizarry M, Scarmeas N, Raju S, Brandt J, Albert M, Blacker D, Hyman B, Stern Y. (2008). Distinct pools of beta-amyloid in Alzheimer disease-affected brain: a clinicopathologic study. *Arch Neurol.*2008;65:906–912
128. Dickson TC, Vickers JC. (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001;105:99–107
129. O'Nuallain B, Wetzel R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1485–1490

130. Nilsson KP, Aslund A, Berg I, Nystrom S, Konradsson P, Herland A, Inganas O, Stabo-Eeg F, Lindgren M, Westermarck GT, Lannfelt L, Nilsson LN, Hammarstrom P. (2007). Imaging distinct conformational states of amyloid-beta fibrils in Alzheimer's disease using novel luminescent probes. *ACS Chem Biol.* 2007;2:553–560
131. Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science.* 2005;307:262–265
132. Paravastu AK, Qahwash I, Leapman RD, Meredith SC, Tycko R. (2009). Seeded growth of {beta}-amyloid fibrils from Alzheimer's brain-derived fibrils produces a distinct fibril structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009
133. Wang Y, Klunk WE, Debnath ML, Huang GF, Holt DP, Shao L, Mathis CA. (2004). Development of a PET/SPECT agent for amyloid imaging in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004;24:55–62.
134. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 2004;55:306–319
135. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem.* 1989;177:244–249
136. Vassar PS, Culling CF. (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol.* 1959;68:487–498
137. Naiki H, Higuchi K, Matsushima K, Shimada A, Chen WH, Hosokawa M, Takeda T. (1990). Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T. *Lab Invest.* 1990;62:768–773.

138. Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, Takeda T. (1991). Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro. *Lab Invest.* 1991;65:104–110.
139. Matthew Biancalana, Shohei Koide. (2011). Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim Biophys Acta.* July; 1804(7): 1405–1412.
140. Nelson R, Eisenberg D. (2006). Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16:260–265.
141. Nelson R, Eisenberg D. (2006). Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16:260–265.
142. Collini M, D'Alfonso L, Baldini G. (2000). New insight on beta-lactoglobulin binding sites by 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate fluorescence decay. *Protein Sci.* 2000;9:1968–1974.
143. Collini M, D'Alfonso L, Molinari H, Ragona L, Catalano M, Baldini G. (2003). Competitive binding of fatty acids and the fluorescent probe 1-8-anilinonaphthalene sulfonate to bovine beta-lactoglobulin. *Protein Sci.* 2003;12:1596–1603.
144. Matulis D, Lovrien R. (1998). 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys J.* 1998;74:422–429.
145. Lartigue A, Gruez A, Spinelli S, Riviere S, Brossut R, Tegoni M, Cambillau C. (2003). The crystal structure of a cockroach pheromone-binding protein suggests a new ligand binding and release mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278:30213–30218.
146. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119:598–620.

147. Butterfield DA.(2002). Amyloid  $\beta$ -peptide (1–42)–induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Rad Res* 2002; 36:1307–1313.
148. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M.(1996).  $\beta$ -amyloid–mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996; 380:168–171. 119.
149. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 1994; 77: 817–827.
150. Busciglio J, Yankner BA. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995; 378:776–779.
151. Oteiza PI. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron– induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308:374–379.
152. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A et al. (1996). RAGE and amyloid  $\beta$  peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996;382:685–6891.
153. Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, et al. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996;382:120–121.
154. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, et al. (1994). A model for beta–amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3270–3274.
155. Della Bianca V, Dusi S, Bianchini E, Dal Pr I, Rossi F. (1999).  $\beta$ -amyloid activates the O<sub>2</sub> forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1999; 274:15493–15499.

156. Rogers J, Lue LF. (2001). Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39:333–340.
157. Blum–Degen D, Frolich L, Hoyer S, Riederer P.(1995). Altered regulation of brain glucose metabolism as a cause of neurodegenerative disorders. *J Neural Transm* 1995; S139–S147.
158. B.L. Miller, T.D. Williams, C. Schöneich. (1996), Mechanism of sulfoxide formation through reaction of sulfur radical cation complexes with superoxide or hydroxide ion in oxygenated aqueous solution *J. Am. Chem. Soc.*, 118, pp. 11014–11025
159. E.R. Stadtman. (2004). Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, pp. 2–5
160. C. Schöneich, F. Zhao, K.P. Madden, K. Bobrowski. (1994). Side chain fragmentation of N-terminal threonine or serine residue induced through intramolecular proton transfer to hydroxy sulfuranyl radical formed at neighboring methionine in dipeptides *J. Am. Chem. Soc.*, 116, pp. 4641–4652
161. D. Allan Butterfield, Veronica Galvan, Miranda Bader Lange, Huidong Tang, Renā A. Sowell, Patricia Spilman, Joanna Fombonne, Olivia Gorostiza, Junli Zhang, Rukhsana Sultana, Dale E. Bredesen. (2011). In vivo oxidative stress in brain of alzheimer disease transgenic mice: requirement for methionine 35 in amyloid  $\beta$ -peptide of app. *Free Radic Biol Med*.
162. S.M. Yatin, S. Varadarajan, D.A. Butterfield. (2000). Vitamin E prevents Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1–42)-induced protein oxidation and reactive oxygen species formation *J. Alz. Dis.*, 2, pp. 123–131
163. S.M. Yatin, S. Varadarajan, C. Link, D.A. Butterfield. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1–42) *Neurobiol. Aging*, 20, pp. 325–330

164. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC. (2009). The betasecretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29:12787–12794
- 165 Haass C, Selkoe DJ. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):101–12. Epub 2007/01/25.
- 166 Tjernberg LO, Callaway DJ, Tjernberg A, Hahne S, Lilliehook C, Terenius L, et al. (1999). A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12619–25.
- 167 Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B.(1996). Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(3):672–80.
- 168 Cruz M, Tusell JM, Grillo-Bosch D, Albericio F, Serratos J, Rabanal F, et al. (2004). Inhibition of beta-amyloid toxicity by short peptides containing N-methyl amino acids. *J Pept Res.* 2004;63(3):324–8.
- 169 Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, et al. (2003). Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34874–81.
170. Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, et al. (2003). Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34874–81.
171. Hardy J.A., Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992;256:184–185.
172. Erten-Lyons D., Woltjer R.L., Dodge H., Nixon R., Vorobik R., Calvert J.F., Leahy M., Montine T., Kaye J. (2009). Factors associated with resistance to dementia despite high Alzheimer disease pathology. *Neurology.* 2009;72:354–360

173. Sloane J.A., Pietropaolo M.F., Rosene D.L., Moss M.B., Peters A., Kemper T., Abraham C.R. (1997). Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey. *Acta Neuropathol.* 1997;94:471–478
174. Gandy S., Simon A.J., Steele J.W., Lublin A.L., Lah J.J., Walker L.C., Levey A.I., Krafft G.A., Levy E., Checler F., Glabe C., Bilker W., Abel T., Schmeidler J., Ehrlich M.E. (2010). Days-to-criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomers. *Ann. Neurol.* 2010;68:220–230
175. Götz J, Ittner LM, Schonrock N, Cappai R. (2008). An update on the toxicity of Abeta in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* Dec; 4(6):1033-42
176. D.M. Walsh, D.J. Selkoe. (2007). A beta oligomers - a decade of Discovery *J. Neurochem.*, 101, pp. 1172–1184.
177. .W. Hamley. (2012). The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization *Chem. Rev.*, 112, pp. 5147–5192
178. Hughes, E., Burke, R.M. & Doig, A.J. (2000) Inhibition of toxicity in the b-amyloid peptide fragment b(25–35) using N-methylated derivatives. *J. Biol. Chem.* 275, 25109–25115
179. Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castan˜ o, E.M. & Frangione, B. (1998) b-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.* 4, 822–838.
180. Tjernberg, L.O., Naˆslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstroˆm, A.R., Thyberg, J., Terenius, L. & Nordstedt, C. (1996) Arrest of b-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* 271, 8545–8548



181. Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, et al. (2003). Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34874–81.
182. Cruz M1, Tusell JM, Grillo-Bosch D, Albericio F, Serratosa J, Rabanal F, Giralt E. (2004). Inhibition of beta-amyloid toxicity by short peptides containing N-methyl amino acids. *J Pept Res.* 2004 Mar;63(3):324-8.
183. LeVine H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 1993;2:404–410.
184. Groenning M.(2009). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J Chem Biol.*
185. Batzli KM, Love BJ. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* (2015). Agitation of amyloid proteins to speed aggregation measured by ThT fluorescence: a call for standardization. *Mater Biol Appl.* 2015 Mar;48:359-64.
186. Kazuki Sato, Akiko Wakamiya, Tadakazu M. (1995). Correlation among Secondary Structure, Amyloid Precursor Protein Accumulation, and Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ (25-35) Peptide as Analyzed by Single Alanine Substitution. *Rapid Communication J. Biochem.* 118, 1108-1111.
187. Yoshiike Y.; Akagi T.; Takashima A. (2007) Surface structure of amyloid- $\beta$  fibrils contributes to cytotoxicity. *Biochemistry* 46, 9805–9812.
188. E.R. Stadtman. (2004). Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, pp. 2–5